

**Mikrosatellitenmarkeranalyse von metastasierten
Nierenzellkarzinomen zur Ermittlung
prognosedifferenzierender genetischer Marker**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich Schiller Universität Jena

von Mirko Leonhardt
geboren am 12.02.1977 in Oelsnitz i. V.

Gutachter:

1. PD Dr. K. Junker, Jena
2. Prof. Dr. U. Claussen, Jena
3. Prof. Dr. A. Hartmann, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Ätiologie und Inzidenz des Nierenzellkarzinoms	3
2.1.1. Inzidenz	3
2.1.2. Ätiologie	5
2.2. <u>Stadieneinteilung der Nierenzellkarzinome</u>	5
2.2.1. TNM-Klassifikation	5
2.2.2. Klassifikation nach Robson	8
2.3. <u>Histopathologische Klassifikation der Nierenzellkarzinome</u>	8
2.4. <u>Symptomatik und Diagnostik</u>	13
2.5. <u>Therapie</u>	14
2.6. <u>Genetik der Nierenzellkarzinome</u>	17
2.6.1. Konventionelle Nierenzellkarzinome	17
2.6.1.1. Sporadische Form	17
2.6.1.2. Familiäre Form	18
2.6.2. Papilläre Nierenzellkarzinome	19
2.6.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome	20
2.6.4. Nierenonkozytome	20
2.6.5. Sammelrohrkarzinome (Bellini-Duct-Karzinome)	21
2.6.6. Metanephrogene Adenome	21
3. Zielstellung	22
4. Material und Methoden	23
4.1. <u>Patientenauswahl</u>	23
4.1.1. Patientenzahl und Untersuchungszeitraum	23
4.1.2. Geschlechts- und Altersverteilung	23
4.2. <u>Methoden</u>	25
4.2.1. Gewinnung der Gewebeproben	25
4.2.2. DNA- Isolation	25
4.2.3. Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	26
4.2.4. DOP-PCR	27
4.2.5. Kontrollelektrophorese	28
4.2.6. Markierung	29
4.2.7. Hybridisierung	30

4.2.8. Detektion	30
4.2.9. Auswertung	31
4.2.10. Mikrosatellitenmarkeranalyse	34
4.2.11. Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.2.12. Gel-Elektrophorese	38
4.2.13. Statistische Berechnung	39
5. Ergebnisse	40
5.1. <u>Histologie</u>	40
5.2. <u>Tumorstadium und Tumorgrading</u>	41
5.3. <u>Mikrosatellitenmarkeranalyse</u>	45
5.3.1. <u>Genetische Veränderungen auf Chromosom 9</u>	45
5.3.2. <u>Genetische Veränderungen auf Chromosom 18</u>	50
5.4. <u>Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)</u>	54
5.5. <u>Vergleich der Ergebnisse zwischen CGH und MSA</u>	61
6. Diskussion	64
6.1. <u>Korrelation der nachgewiesenen Mikrosatellitenmarkerveränderungen zur Metastasierung unter besonderer Berücksichtigung der klarzelligen Nierenzellkarzinome</u>	64
6.1.1. Analyse genetischer Veränderungen spezifischer Regionen auf Chromosom 9	64
6.1.2. Analyse genetischer Veränderungen spezifischer Regionen auf Chromosom 18	66
6.2. <u>Analyse der chromosomalen Veränderungen mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) in Korrelation zur Metastasierung</u>	67
6.3. <u>Vergleich der mit Hilfe der MSA und der CGH identifizierten genetischen Veränderungen</u>	69
7. Schlußfolgerung	70
8. Anhang	71
8.1. <u>Tabellen</u>	71
8.2. <u>Literaturverzeichnis</u>	80
8.3. <u>Ehrenwörtliche Erklärung</u>	91
8.4. <u>Lebenslauf</u>	92
8.5. <u>Danksagung</u>	93

Abkürzungsverzeichnis

ADT – Arbeitsgemeinschaft deutscher Tumorzentren

Ca – Karzinom

CGH – vergleichende Genomhybridisierung

CDK – cyclin-dependent-kinase

DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid

DIRC – Disrupted in renal carcinoma

Dim – diminution

DNA – Desoxyribonukleinsäure

Enh – enhancement

FHIT – fragile histidine triade

FISH – Floureszenz-in-situ-Hybridisierung

FSU – Friedrich-Schiller-Universität

FITC – Fluoreszeinisoithiozyanat

LOH – Loss of heterozygosity

MET – Onkogen aus der Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren

MSA – Mikrosatellitenmarkeranalyse

MTS – Metastasen

NZK – Nierenzellkarzinom

NZT – Nierenzelltumoren

PCR – Polymerasekettenreaktion

Shift – Verschiebung im genetischen Leserahmen

Taq – Thermophilus aquaticus

TNM – Tumor-Nodus-Metastasis(-Klassifikation)

TSG – Tumorsuppressorgen

UICC – Union internationalis contra cancrum

VHL – Von-Hippel-Lindau

WHO – Weltgesundheitsorganisation

1. Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinomen wird wesentlich durch den Metastasierungsstatus bestimmt. Aufgrund der hohen Metastasierungsrate von ca. 60 % ist eine engmaschige Nachsorge erforderlich. Bei fehlenden Prognoseparametern ist eine risikoadaptierte Nachsorge nur sehr begrenzt möglich. Auf Basis klinischer und histopathologischer Parameter können metastasierte Nierenzellkarzinome nur unzureichend differenziert werden. Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Metastasierung der NZK mit spezifischen genetischen Alterationen assoziiert ist. Verluste des Chromosoms 9 und 18 waren dabei signifikant häufiger bei metastasierten Tumoren nachgewiesen worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, kritische Regionen auf den Chromosomen 9 und 18 einzugrenzen, die mit der Metastasierung in Verbindung stehen.

Hierfür wurde die Mikrosatellitenmarkeranalyse (MSA) eingesetzt und für die Chromosomen 9 und 18 jeweils 6 Marker aus allgemein zugänglichen Datenbanken ausgewählt. Mindestens mit einem Marker fanden sich Verluste in 81 % der metastasierten und in 47 % der nichtmetastasierten Tumoren. Der Unterschied war statistisch signifikant. Auch unter separater Betrachtung der klarzelligen Nierenzellkarzinome zeigte sich ebenfalls eine statistisch signifikante Häufung von 9p-Alterationen. In einem weiteren Schritt wurden die einzelnen Marker analysiert. Für den Marker L5 in der Region 9p13 wurde sowohl über die gesamte Untersuchungsgruppe als auch unter Einbeziehung ausschließlich klarzelliger NZK eine Häufung von Verlusten in den metastasierten Tumoren nachgewiesen (43 % vs. 11 % bzw. 38 % vs. 7 %), die für alle Tumoren unabhängig von der Histologie statistisch signifikant war.

Auch für Chromosom 18 wurden häufiger Verluste in metastasierten als in nichtmetastasierten Tumoren gefunden (57 % vs. 37 %). Für die klarzelligen Tumoren sahen die Ergebnisse ähnlich aus (63 % vs. 40 %). Die Analyse der einzelnen Marker zeigte, dass bis auf den Marker M7 die Frequenz von Alterationen gering war. Mit diesem Marker wurden jedoch statistisch signifikant mehr Verluste in den metastasierten Tumoren festgestellt (48 % vs. 16 %). Auch unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Tumoren bestätigte sich dies (56 % vs. 20 %). Auffällig waren homozygote Deletionen, die deutlich häufiger bei metastasierten Tumoren dokumentiert werden konnten.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde das genetische Material der 40 Tumoren mittels Vergleichender Genomischer Hybridisierung untersucht. Statistische Signifikanz konnte für Verluste der Chromosomenarme 9q (38 % vs. 7 %) und 14q (44 % vs. 6,7 %) sowie für

Zugewinne auf 4q (20 % vs. 0 %) bei metastasierten klarzelligen Tumoren erreicht werden. Durch CGH ließen sich Verluste auf 18q nur in 6,3 % der Fälle bei den metastasierten klarzelligen Tumoren nachweisen. Bei nichtmetastasierten klarzelligen Tumoren konnten wir keine Deletionen finden. Dies kann am ehesten durch die geringere Sensitivität der CGH im Vergleich zur Mikrosatellitenmarkeranalyse bei der Detektion submikroskopischer Veränderungen erklärt werden.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Prognosebewertung hinsichtlich der Metastasierung am Primärtumor anhand spezifischer genetischer Muster möglich ist. Vor dem Einsatz dieser Parameter im klinischen Alltag sind jedoch weiterführende molekulargenetische Untersuchungen erforderlich.

2. Einleitung

Der wichtigste Einzelparameter zur Beurteilung der Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinomen ist neben dem Tumorstadium die Metastasierung. Zum Zeitpunkt der Diagnose oder im Verlauf nach potentiell kurativer Operation weisen mehr als 50 % aller Patienten mit Nierenzellkarzinomen Fernmetastasen auf. Bei vorliegender Metastasierung ist die Prognose als schlecht einzuschätzen. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer aufwendigen Nachsorge, die jedoch vor dem Hintergrund ökonomischer Zwänge zunehmend kritisch diskutiert wird. Eine risikoadaptierte Nachsorge ist nur begrenzt möglich. Zum anderen ist die Selektion von Risikopatienten für eine adjuvante Therapie individuell nicht gegeben.

Als bester Prognoseparameter gilt derzeit die T-Kategorie. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium pT1 und pT2 ca. 86%, im Stadium pT4 unter 20 %. Neben dem Tumorstadium haben der körperliche Zustand des Patienten, die Zeit zwischen Diagnose des Primärtumors und Auftreten von Metastasen, sowie die Lokalisation und Anzahl der Metastasen Einfluß auf das Überleben. Eine individuelle Prognoseabschätzung ist anhand dieser Parameter nicht möglich. Derzeit werden zahlreiche tumorbiologische Faktoren untersucht, um die spezifischen Signalwege in den Tumorzellen aufzuklären. Durch Analyse der genetischen Veränderungen metastasierter Tumoren kann die Grundlage für eine individuelle Nachsorge und Therapiewahl geschaffen werden. Ziel dieser Studie war deshalb die Analyse spezifischer chromosomaler Regionen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Metastasierung der Nierenzellkarzinome.

2.1. Ätiologie und Inzidenz des Nierenzellkarzinoms

2.1.1. Inzidenz

In der Bundesrepublik Deutschland stellen die malignen Tumoren nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Das Nierenzellkarzinom ist nach dem Prostata- und Harnblasenkarzinom die dritthäufigste maligne urologische Erkrankung. Es hat einen Anteil von 3-4% an der Gesamtzahl der bösartigen Tumorerkrankungen des Erwachsenenalters. Männer sind dabei doppelt so häufig wie Frauen betroffen (Boeckmann und Jakse 1997, Wunderlich und Schubert 2001).

Es besteht außerdem eine Altersabhängigkeit, da bis zum 45. Lebensjahr 1,1 Frauen und 1,9 Männer, zwischen dem 45. und dem 64. Lebensjahr 14 Frauen und 31 Männer, sowie

bei den über 65jährigen 37 Frauen und 81 Männer pro 100.000 Personen pro Jahr erkranken (Boeckmann und Jakse 1997).

Die Inzidenz wird in der Literatur mit bis zu 9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner angegeben. In den 70er Jahren wurden 6 bis 7 Neuerkrankungen pro Jahr beobachtet (Steinbach et al. 1992). Für Deutschland beschrieben Holzel & Altwein eine Zunahme der Nierenzellkarzinom-Inzidenz um 15 bis 20 % (Holzel und Altwein 1991). Wunderlich et al. konnten eine Inzidenzsteigerung von 1,3 % (1985) auf 2,2 % (1996) im Raum Jena nachweisen. Dabei ist neben der verbesserten bildgebenden Diagnostik auch eine echte Inzidenzzunahme nicht auszuschließen. Durch den flächenhaften Einsatz der Sonographie scheint sich das Verhältnis zwischen bekannten und unbekannten Nierenzellkarzinom umgekehrt zu haben. Während Hellsten et al. in seiner Studie zwischen 1958 und 1969 die Zahl der zum Sektionszeitpunkt bekannten Tumoren mit 32,9 % angibt, so sind es zwischen 1985 und 1996 bei Wunderlich et al. 52,9 % (Hellsten et al. 1981, Hellsten et al. 1990, Wunderlich et al. 1998).

In der Europäischen Gemeinschaft starben zwischen 1978 und 1982 schätzungsweise 14.000 Personen jährlich an einem Nierentumor. Die Zahl der Neuerkrankungen lag 1990 nach Jensen et al. bei 27.000 pro Jahr (Boeckmann und Jakse 1997). In Skandinavien ist die Inzidenz am höchsten, in Japan war sie 1988 laut Paganini-Hill et al. mit 1,5 Neuerkrankungen pro 100.000 im Jahr am geringsten (Boeckmann und Jakse 1997).

2.1.2. Ätiologie

Die Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist noch in vielerlei Hinsicht ungeklärt. Es entsteht zu einem großen Teil sporadisch. Nach heutigen Vorstellungen sind verschiedene exogene Faktoren (Kanzerogene, Risikofaktoren, Umwelteinflüsse), sowie Veränderungen in der Zellbiologie ursächlich. Sowohl erbliche als auch erworbene Veränderungen der Genstruktur sind eine der Hauptursachen der Tumorinduktion und –progression (Wunderlich und Schubert 2001).

Zu den tumorauslösenden Faktoren gehören Medikamente, Tabakkonsum, Adipositas, hormonelle Faktoren, sowie eine durch die zunehmende Industrialisierung bedingte Schwermetallbelastung mit Cadmium und Blei. Bei den Medikamenten sind dabei besonders phenacetinhaltige Analgetika, β -Blocker und Appetitzügler zu nennen (Gago-Dominguez et al. 1999, McCredie und Stewart 1992, Yuan et al. 1998). Auch bei fett- und eiweißreicher Ernährung könnte es sich um einen Risikofaktor für die Entstehung von Nierenzellkarzinomen handeln (Handa und Kreiger 2002). Mit zunehmendem Body-Mass-Index ist ein erhöhtes Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, verbunden, wobei dieser Zusammenhang stärker bei Frauen ausgeprägt ist (Chow et al. 1996, Gago-Dominguez et al. 1999, Møller et al. 1994). Auch Patienten mit Diabetes mellitus erkranken durchschnittlich häufiger an diesem Tumor (Lindblad et al. 1999). Terminal niereninsuffiziente Patienten, die während mehrjähriger Dialyse Nierenzysten entwickeln, erkranken gehäuft an von diesen Zysten ausgehenden Nierenkarzinomen. Dabei besteht kein Zusammenhang mit der Art der Dialyse (Boeckmann und Jakse 1997, Stewart et al. 2003). Widersprüchliche Angaben finden sich in der Literatur über eine mögliche karzinogene Wirkung von Diuretika (Boeckmann und Jakse 1997, McCredie und Stewart 1992, Yuan et al. 1998).

2.2. Stadieneinteilung der Nierenzellkarzinome

Die klinische Charakterisierung der Nierenzellkarzinome erfolgt in Europa nach dem TNM-System, in den USA findet vorwiegend die Klassifikation nach Robson Verwendung.

2.2.1. TNM- Klassifikation

Bei der TNM-Klassifikation handelt es sich um eine von der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) entwickelte Einteilung von malignen Tumoren (1997). Die Ergebnisse aus klinischer Untersuchung, radiologischer und ggf. auch invasiver Diagnostik führen zur Festlegung der entsprechenden Parameter. Dazu gehören die Tumorausbreitung (**T**), der

Befall regionärer Lymphknoten (**N**) sowie die Fernmetastasierung (**M**). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die aktuell gültige Klassifikation.

Primärtumor(T)	Regionäre Lymphknoten(N)	Fernmetastasen(M)
Tx –Primärtumor kann nicht beurteilt werden	Nx –regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	Mx –Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
T0 –kein Anhalt für Primärtumor	N0 –keine regionären Lymphknoten metastasen	M0 –keine Fernmetastasen
T1a–Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung	N1 –Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung	M1 –Fernmetastasen
T1b–Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung	N2 –Metastase in mehr als einem benachbarten Lymphknoten	
T2 –Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf Niere		
T3a–Tumor infiltriert die perirenale Fettkapsel oder Nebenniere, Gerotafaszie intakt		
T3b–Tumorausdehnung in die Nierenvenen oder die V. cava infradiaphragmal		
T3c–Tumorausdehnung in die V. cava supra-diaphragmal		
T4 –Tumor durchbricht die Gerota-Faszie		

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der UICC (überarbeitete Version von 2002)

Daraus ergeben sich folgende Stadien:

	pM0			pM1
	pN0	pN1	pN2(3)	
pT1	St.1			
pT2	St.2			
pT3	St.3			
pT4	St.4			

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Nierenzellkarzinome (aus Qualitätssicherung in der Urologie, Pomer et al. 1998)

Nach histologischer Sicherung der Diagnose wird dies durch hinzufügen von „p“ dargestellt. Die pT-, pN- und pM-Kategorien entsprechen den T-, N- und M-Kategorien. Es gibt hier folgende Erfordernisse (Pomer et al. 1998):

1. Histologische Untersuchung des Primärtumors ohne makroskopisch erkennbaren Tumor an den Resektionsrändern oder mikroskopische Bestätigung der Infiltration bis jenseits der Gerota-Faszie (pT4)
2. pN1: Mikroskopische Bestätigung einer Metastasierung in einem solitären regionären Lymphknoten
3. pN0: Histologische Untersuchung von 8 oder mehr regionären Lymphknoten
4. pN2: Mikroskopische Bestätigung von mindestens 2 metastatisch befallenen regionären Lymphknoten
5. pM1: Mikroskopischer (histologischer oder zytologischer) Nachweis von Fernmetastasen

Die Beschreibung der Tumordinfiltration in die Venen als V0 - VX ist im TNM-Atlas der UICC nicht mehr gesondert differenziert, sondern in die T-Stadien eingearbeitet worden (Pomer et al. 1998). Für die Vorhersage der individuellen Prognose ist das TNM-System jedoch unzureichend. Hier finden zunehmend verschiedene tumorbiologische Faktoren Verwendung (Wunderlich und Schubert 2001).

2.2.2. Klassifikation nach Robson

Diese frühere Einteilung wurde im deutschen Sprachraum weitgehend verlassen. Sie spielt jedoch bei vielen Publikationen aus den USA und Kanada weiterhin eine wichtige Rolle. Es wird nicht zwischen Lymphknoten- und Nierenveneninfiltration unterschieden. Die Größe des Primärtumors ist hier kein eigenständiges Merkmal. Dabei scheint gerade dies ein wichtiges Prognosekriterium darzustellen (Kath 2003). Die Überlebensraten von Patienten mit Stadium-I-Tumoren nach Robson unterscheiden sich signifikant bei einer Tumorgöße von 5,5 cm (Kinouchi et al. 1999).

Eine Übersicht gibt Tabelle 3.

Stadium	Definition
I	auf Niere begrenzt
II	Ausbreitung in perirenales Fettgewebe innerhalb der Gerota-Faszie
IIIA	Ausbreitung in Nierenvene(n) / V.cava
IIIB	Regionäre Lymphknotenmetastasen
IIIC	Veneninvasion und regionäre Lymphknotenmetastasen
IV	Infiltration von Nachbarorganen und Fernmetastasen

Tabelle 3: Klassifikation nach Robson (modifiziert nach Boeckmann und Jakse 1997)

Bei lokal begrenzten Tumorstadien ist die UICC-Klassifikation der Einteilung nach Robson hinsichtlich prognostischer Validität überlegen. Bei fortgeschrittenen Stadien ist der Unterschied in den Systemen von untergeordneter prognostischer Bedeutung (Dörsam und Staehler 2001).

2.3. Histopathologische Klassifikation der Nierenzellkarzinome

Bei etwa 90% der renalen Malignome des Erwachsenen handelt es sich um epitheliale Neubildungen des Nierenparenchyms. Unter den restlichen 10% finden sich Urothel- und Plattenepithelkarzinome. Onkozytome sind sehr selten. Sie sind gutartig und metastasieren nicht. Die Nierenzellkarzinome entstehen aus den Epithelien der verschiedenen Tubulusabschnitte. Das Nephroblastom (Wilms-Tumor) kommt fast ausschließlich im Kindesalter vor. Es ist mit ca. 20% aller kindlichen Malignome ein relativ häufiger Tumor (Mostofi F.K. 1981).

Thoenes et al. entwickelten Ende der 80er Jahre die Mainz-Klassifikation. Sie wurde in den Folgejahren weiter überarbeitet (Pomer et al. 1998). Die histopathologische Einteilung erfolgt hierbei nach Tumorzelltyp, Wachstumsmuster und zytologischem Grading. Nur noch 1-4% aller Fälle lassen sich so nicht klassifizieren (Dörsam und Staehler 2001). Nach diesen Kriterien können verschiedene Subtypen des Nierenzellkarzinoms und –adenoms unterschieden werden.

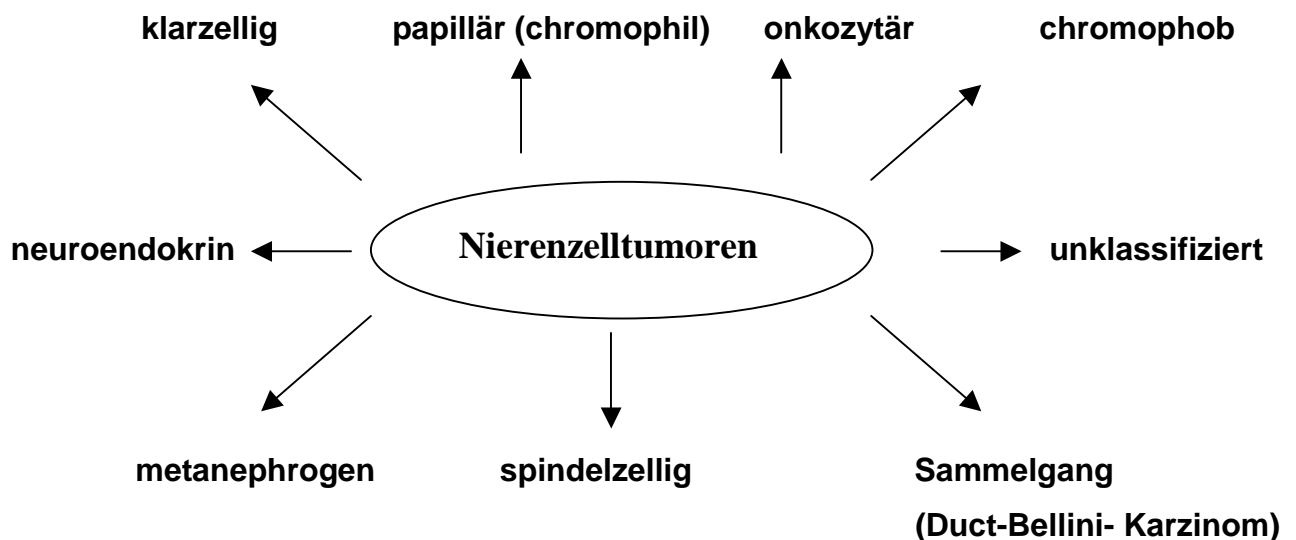


Abbildung 1: Einteilung der Nierenzellkarzinome (nach Storkel 1999)

Mit einem Anteil von 70-76 % ist das **klarzellige Nierenzellkarzinom** die häufigste Variante (Thoenes et al. 1986a, Thoenes und Storkel 1991). Es ist charakterisiert durch vielknotige Tumormassen und ein breites Farbspektrum. Die Schnittfläche erscheint gelblich und entspricht hochdifferenzierten Tumoranteilen. Die vereinzelten grauen oder weißen Herde lassen sich wenig differenzierten Arealen zuordnen. Oft bildet der Tumor eine makroskopisch erkennbare Pseudokapsel, die durch Verdrängung von normalem Nierengewebe entsteht. In den meist soliden Tumoren finden sich gelegentlich Verkalkungen sowie Tumornekrosen mit Einblutung. Zysten sind eher selten. Lichtmikroskopisch erscheint das Zytoplasma im Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparat wasserklar, die Zellkerne liegen zentral oder exzentrisch (Dörsam und Staehler 2001, Storkel 1999).

Das **chromophile Nierenzellkarzinom**, auch als papilläres Karzinom bezeichnet, ist mit einem Anteil von 10 % der zweithäufigste Tumortyp. Es tritt gehäuft multifokal auf. Die Schnittfläche erscheint makroskopisch gelblich bis gelbbraunlich. Es finden sich Nekrosen mit Hämorrhagien. Histologisch lassen sich ein basophil-kleinzelliger und ein eosinophiler

Typ unterscheiden, auch Übergangsformen kommen vor. Die Zellkerne sind klein und hyperchromatisch, sonstige Zellorganellen eher spärlich. Die Tumorpapillen sind mit Schaumzellen (fettspeichernde Makrophagen) angefüllt. Deshalb erscheinen die Tumoren im Gefrierschnitt in polarisiertem Licht doppelbrechend (Dörsam und Staehler 2001, Storkel 1999, Thoenes et al. 1986).

Chromophobe Karzinome haben eine Häufigkeit von 5 %. Die Schnittfläche ist unfixiert orange- bzw. fixiert beigefarben. Es finden sich einzelne Blutungsherde. Die Zellen sind polygonal, groß und haben ein fein retikulierte Zytoplasma. Charakteristisch ist die stark positive Reaktion bei der Färbung mit Hale-Eisenkolloid (Dörsam und Staehler 2001, Storkel 1999).

Die vom Sammelrohrsystem ausgehenden Karzinome (**Duct-Bellini-Typ**) haben meist einen großen Durchmesser und sind im Nierenmark lokalisiert. Ihre Häufigkeit liegt unter 1 %. Es kann eine hochdifferenzierte und eine hochaggressive Form unterschieden werden. Letztere ist mit einer Sichelzellanämie assoziiert. Die Schnittfläche ist weiß und gelegentlich von Nekrosen durchsetzt. Fast immer finden sich eine Tumorausdehnung in Nebennieren und Lymphknoten. Mikroskopisch sind die Zellen durch Polymorphie und Anaplasie gekennzeichnet. Ihre Kerne erscheinen variabel in Form und Größe (Brkovic und Waldherr 1997, Dörsam und Staehler 2001, Storkel 1999).

Nierenzelladenome vom onkozytären Typ sind benigne Tumoren, die meist solitär auftreten. Sie haben eine braune Schnittfläche und häufig eine zentrale Narbe. Gelegentlich findet man Einblutungen, Nekrosen dagegen nie. Die Zellen sind lichtmikroskopisch eosinophil mit granulärem Zytoplasma. Die Ursache hierfür ist der erhöhte Gehalt an atypischen Mitochondrien. Die Zellen sind z.T. mehrkernig. Mitosen sind selten. Dies ist zusammen mit dem Fehlen prominenter Nukleoli ein wichtiges Kriterium bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung gegen andere eosinophile Varianten des Nierenzellkarzinoms (Brkovic und Waldherr 1997, Dörsam und Staehler 2001, Storkel 1999).

Metanephrogene Adenome finden sich zumeist in der Nierenrinde. Ihre Schnittfläche ist sandfarben und glänzt leicht. Die Tumorzellen sind dicht gepackt. Mitosen sind sehr selten. Charakteristisch sind Stromaverkalkungen in den Randpartien des Tumors (Dörsam und Staehler 2001, Storkel 1999).

Ein sehr seltener Tumor ist das **neuroendokrine Nierenzellkarzinom**. Es handelt sich dabei um einen sehr aggressiven Tumor, der zu einer ausgedehnten Destruktion des Nierenparenchyms führt. Er infiltriert in Nierenbecken und perirenales Fettgewebe. Im Anschnitt erscheint dieser Tumor grau und ist von erweichten Nekrosen durchsetzt.

Das **Karzinom vom Transitionaltyp** ist ein sehr größenvariabler Tumor. Es ist im Anschnitt grau und zeigt häufig Nekrosen und Blutungen. Es infiltriert- ebenso wie das Sammelgangskarzinom- Hilusregion und Fettkapsel (Storkel 1999).

Zur Bestimmung des Malignitätsgrades von Tumoren existieren verschiedene Systeme. Im von der WHO empfohlenen Grading werden Grad der Anaplasie und Kerngröße ebenso wie in der Mainz-Klassifikation berücksichtigt (Pomer et al. 1998).

Nach Thoenes et al. 1986 werden G1-Tumoren bis 1 cm den Adenomen, über 3 cm den Karzinomen zugeordnet. Nach den Empfehlungen der Organspezifischen Tumordokumentation der ADT werden G1-Tumoren von 1-3 cm zu den Adenomen gezählt (Wagner und Hermanek 1995).

G1	Zellkerne regelmäßig, rund, normale Größe; Nukleolen nicht vergrößert; fast keine Mitosen
G2	Zellkerne vergrößert, mäßige Unterschiede in Größe und Form; 1-2 Nukleolen (vergrößert); gelegentlich Mitosen
G3	beträchtlich vergrößerte Zellkerne; ausgeprägte Polymorphie und Hyperchromasie; stark vergrößerte Nukleolen; häufig atypische Mitosen; vielkernige Riesenzellen

Tabelle 4: Grading nach der Mainz-Klassifikation

Zusätzlich können noch Aussagen zu Lymphgefäß- und Veneninvasion, Einbruch ins Hohlssystem, Tumorregression oder Kapselbildung getroffen werden (Pomer et al. 1998).

Die Prognose kann nach Störkel durch Einbeziehung von Tumorausbreitung, Zelltyp, Grading, Wachstumsform und Alter bestimmt werden. Tabelle 5 zeigt den Mainzer Prognose Score.

Anatomische Ausbreitung	pT1 und pT2	1
	pT3a N0 M0	2
	pT3b+c und/oder pN1-3	4
	pT4 und/oder M1	6
Grading	G1	1
	G2	3
	G3	5
Zelltyp	klarzellig	2
	chromophil	1
	chromophob	1
	spindel-/pleomorphzellig	2
Wuchsform	kompakt	2
	tubulo-papillär	1
	zystisch	1
Alter	< 30	1
	31- 40	2
	41- 50	1
	51- 70	2
	> 70	1

5-9	gute Prognose
10-14	intermediäre Prognose
15-17	schlechte Prognose

Tabelle 5: Mainzer Prognose Score nach Störkel (Pomer et al. 1998)

2.4. Symptomatik und Diagnostik

Das Nierenzellkarzinom ist in den Frühstadien ein asymptomatischer Tumor. Die klassische Trias mit Flankenschmerz, Hämaturie und tastbarer Raumforderung findet sich nur in etwa 5-10 % der Fälle (Boeckmann und Jakse 1997). Beim Auftreten dieser Symptome ist das Tumorleiden oft schon lokal fortgeschritten. Auch weitere unspezifische Tumorzeichen wie Fieber, Gewichtsverlust und Leistungsminderung sind Spätsymptome und meist Folge einer bereits eingesetzten Metastasierung (Leitlinien-Informationssystem der AWMF 2001). Das gilt auch für neu aufgetretene Varikozelen und paraneoplastische Syndrome. Dazu zählen Anämie, Thrombozytose, die tumorassoziierte Erythrozytose, sowie die nicht-metastatische Leberdysfunktion (Stauffer-Syndrom). Ursächlich dafür ist die endokrinologische Aktivität eines Teils der Nierenkarzinome (German Society of Urology 1998). Trotz dieser zahlreichen Veränderungen gibt es keinen Tumormarker, der sich zur Verlaufsbeurteilung eignet.

Beim Erheben der Familienanamnese sollten die von Hippel-Lindau-Erkrankung und die Tuberöse Sklerose ausgeschlossen werden. Die anschließend durchgeführte Harnanalyse kann eine anamnestisch angegebene Hämaturie bestätigen (Boeckmann und Jakse 1997, Pomer et al. 1998).

Ein Großteil der Nierenkarzinome wird heute primär sonographisch diagnostiziert, oft als Zufallsbefund. Bis zu 83 % der Malignome können so bei asymptomatischen Patienten gefunden werden. Diese Tumoren sind signifikant kleiner, haben ein niedrigeres Tumorstadium und seltener Fernmetastasen (Siemer und Uder 2002). Die Sensitivität dieser Untersuchung wird in der Literatur mit bis zu 96 % angegeben, die Spezifität ist wegen morphologischer Ähnlichkeiten mit Zysten, Abszessen und Hämatomen deutlich geringer (Pomer et al. 1998).

Für die Diagnosestellung spielt das Ausscheidungsurogramm nur noch eine geringe Rolle. Es ist jedoch weiterhin bei Patienten mit Hämaturie zur differentialdiagnostischen Abklärung von Urotheltumoren des oberen Harntrakts indiziert (German Society of Urology 1998).

Bei Verdacht auf ein Nierenzellkarzinom oder unklarem sonographischen Befund wird eine Computertomographie empfohlen. Sie kann in 98 % zwischen solider und zystischer Raumforderung der Nieren unterscheiden (Boeckmann und Jakse 1997). Die native CT zeigt keine tumorspezifischen Veränderungen, jedoch können Verkalkungen und Einblutungen hinweisend sein. Besonders wichtig für die Diagnosestellung ist die Beurteilung des Dichteanstiegs nach Kontrastmittelgabe (Aikele et al. 2001). Auch

vergrößerte Lymphknoten und venöse Tumorthromben können gut nachgewiesen werden (Leitlinien-Informationssystem der AWMF 2001).

Bei Patienten mit Kontrastmittelallergie oder Niereninsuffizienz ist die Kernspintomographie das Verfahren der Wahl. Sie kann bei unklaren Befunden auch additiv zu Sonographie und CT eingesetzt werden. Bei der Beurteilung der venösen Gefäßinvasion scheint sie der Spiral-CT gering überlegen zu sein. Die Angiographie hat im Rahmen der Diagnostik an Bedeutung verloren. Sie wird noch vor einer geplanten Segmentresektion eingesetzt (Aikele et al. 2001, Hallscheidt et al. 2000).

Vor einem operativen Eingriff sollte eine Ausbreitungsdiagnostik betrieben werden. Diese beinhaltet eine Thorax-Röntgenuntersuchung in 2 Ebenen und ggf. eine CT der Lunge. Die Skelettszintigraphie kommt nur bei sehr großen Tumoren, bei erhöhter alkalischer Phosphatase und bei bestehender Symptomatik zum Einsatz (Hamm et al. 2001).

2.5. Therapie

Als einzige kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms wird die Operation angesehen. Die Art der chirurgischen Therapie ist von Tumorstadium und Funktion der Restniere abhängig. Bei der klassischen Operationstechnik, der radikalen Nephrektomie, werden Niere, Fettkapsel und proximaler Ureter nach früherer Ligatur der A. renalis entfernt. Sie ist das Standardverfahren bei Patienten mit gesundem Zweitorgan (Boeckmann und Jakse 1997, German Society of Urology 1998, Robson et al. 1969). Durch zunehmende Diagnose kleinerer Tumoren, verbunden mit niedrigerem Tumorgrad und -durchmesser, gewinnt die organerhaltende Operation an Bedeutung (Schlichter et al. 1999).

Sie stellte bislang ein etabliertes Verfahren bei Tumoren mit einer Größe bis 4 cm dar. Nach neueren Erkenntnissen sind die Langzeitergebnisse bei organerhaltenden Operationen von Tumoren bis 7 cm vergleichbar denen der radikalen Nephrektomie. Entsprechend den neuen Leitlinien der *European Association of Urology* 2007 können in Zentren auch Neubildungen mit einer Größe >7 cm organerhaltend operiert werden. Wegen des erhöhten Rezidivrisikos sollte eine engmaschige Nachsorge erfolgen (Becker et al. 2006, Ljungberg et al. 2007).

Es erscheint außerordentlich wichtig, Patienten mit Metastasen nach radikaler Nephrektomie zu identifizieren. In zwei großen randomisierten Studien konnte ein Überlebensvorteil in der Gruppe der nephrektomierten Patienten, die sich im Anschluss einer Immunchemotherapie unterzogen, gegenüber den Patienten, die ausschließlich einer systemischen Therapie zugeführt wurden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die

Tumorlast ein entscheidender Faktor für das Ansprechen der Immunchemotherapie darstellt. Werden Patienten nach Tumornephrektomie mit hohem Risiko für Mikrometastasen der systemischen Immunchemotherapie zugeführt, so ist aufgrund der geringen Tumorlast von einem deutlichen Nutzen dieser Therapie auszugehen (Flanigan et al. 2001, Mickisch et al. 2001, Presti, Jr. et al. 2002).

Die Chemotherapie ist beim Nierenzellkarzinom nicht effektiv. Die in der Literatur angegebenen Ansprechraten von Metastasen auf klassische Zytostatika betragen 4-6 %. Ursache dieser *multi drug resistance* ist die Überproduktion des p-Membranglycoproteins (Amato 2000).

Die Kombinationstherapie aus Interleukin-2 und Interferon- α erreicht Ansprechraten von bis zu 36 % (Kugler et al. 2001, Lopez et al. 1996). Diese Therapie ist jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden. Bislang konnte ein positiver Einfluss der Immuntherapie auf das Überleben nicht belegt werden. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei 4,5 % (Motzer et al. 2000, Pomer et al. 1998). Auch die Wirksamkeit der Hormontherapie ist nur sehr gering. Die Ansprechraten werden in der Literatur mit 0-7 % angegeben (Pomer et al. 1998).

Der Einsatz der adjuvanten Strahlentherapie ist umstritten. In älteren Studien konnte weder durch prä- noch postoperative Bestrahlung ein Überlebensvorteil erzielt werden (Plasswilm et al. 2003). Neuere retrospektive Auswertungen ergaben für das Stadium T3N1 einen Einfluss auf das Überleben und müssen weiter überprüft werden (Kao et al. 1994, Stein et al. 1992). Bei Patienten mit Knochenmetastasen kann durch perkutane Strahlentherapie deutliche Schmerzlinderung erzielt werden.

Bei unstillbaren Blutungen und ausgeprägten lokalen Schmerzen kann neben der palliativen Tumornephrektomie eine Nierenarterienembolisation durchgeführt werden. Durch konsequente Schmerztherapie nach dem WHO-Stufenschema wird die Lebensqualität der Patienten verbessert (Hamm et al. 2001).

Ein neuer Ansatz bei der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist die kombinierte Anwendung von Angiogenesehemmern und Zytokinen. Die Grundlage hierfür bildet die vermehrte Expression von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren bei diesem Tumor. Es wurde eine Reihe vielversprechender neuer Substanzen entwickelt. Auf dem ASCO 2006 wurde eine randomisierte Phase-III-Studie von Sorafenib gegenüber Placebo vorgestellt, bei der ein Überlebensvorteil zugunsten von Sorafenib (19,3 versus 14,3 Monate) nachgewiesen werden konnte. Sorafenib ist bei der Mehrzahl der Patienten gut verträglich. Eine randomisierte Phase-III-Studie verglich Sunitinib mit IFN-alpha als Erstlinientherapie bei 750 Patienten mit metastasiertem

Nierenzellkarzinom. Der primäre Endpunkt der Studie, das progressionsfreie Überleben, betrug unter Sunitinib elf Monate gegenüber fünf Monaten unter IFN-alpha. Der antitumorale Effekt ist bei Sunitinib und Sorafenib mit ca. 80 % ähnlich. Das Nebenwirkungsprofil von Sunitinib ist geringfügig ungünstiger im Vergleich zu Sorafenib, welches sich nunmehr als wirksamste neue Substanz zur Erstlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms anbietet. Temsirolimus ist ein Inhibitor der mTOR (mamalian Target of Rapamycin)-Kinase, welche eine zentrale Schnittstelle zahlreicher Signaltransduktionswege beim Nierenzellkarzinom ist. Den primären Endpunkt der Studie bildete das Gesamtüberleben (10,9 Monate gegenüber 8,4 Monaten für die Kombination und 7,3 Monaten für die Monotherapie mit IFN-alpha). Der Unterschied war signifikant zugunsten der Monotherapie mit Temsirolimus. Die Kombination mit IFN-alpha zeichnete sich durch erhöhte Nebenwirkungen, jedoch nicht durch bessere Wirksamkeit aus, was durch die geringere Dosierung der Einzelsubstanzen in dieser Studie bedingt sein könnte. Temsirolimus ist die erste Substanz, für die eine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom nachgewiesen ist (Motzer et al. 2002, Roigas 2006).

2.6. Genetik der Nierenzellkarzinome

Das Nierenzellkarzinom ist aus zytogenetischer und molekularbiologischer Sicht eine heterogene Erkrankung. Bei wechselndem histologischen Erscheinungsbild oder entdifferenzierten Tumoren kann durch Verwendung zytogentischer Kriterien eine objektive Klassifikation erreicht werden. Durch diese Untersuchungstechnik kann selbst an geringem Zellmaterial eine eindeutige Diagnose gestellt werden. Der „Heidelberg-Klassifizierung“ werden charakteristische genetische Merkmale der unterschiedlichen Tumoren zugrunde gelegt (Kovacs 1999, Pomer und Staehler 1998).

2.6.1. Konventionelle Nierenzellkarzinome

2.6.1.1. Sporadische Form

Nierenzelltumoren können sowohl vererbt werden als auch sporadisch auftreten. Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist durch einen Allelverlust der Chromosom 3p- Region gekennzeichnet (Zbar et al. 1996). Durch mutationsbedingte Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens und durch Deletion des zweiten Allels auf Chromosom 3p kommt es so zur Entwicklung von klarzelligen Nierenzelltumoren.

Beim sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom finden sich somatische VHL-Mutationen. Der Genfunktionsverlust erfolgt nach der Zweittreffer-Theorie von Knudson in zwei Schritten. Durch Mutation oder Deletion wird ein Allel inaktiviert. Wegen der Restfunktion des zweiten (normalen) Allels kommt es nicht zur Karzinogenese. Erst durch Veränderung dieses Allels wird die Nierenkarzinomentstehung initiiert (Brauch et al. 1995, Knudson, Jr. 1986, Pomer und Staehler 1998). Das VHL-Gen besteht aus drei Exons mit insgesamt 852 Basenpaaren, die für ein Protein aus 284 Aminosäuren kodieren. Das Genprodukt (pVHL) ist Bestandteil einer Ubiquitin-Proteinligase und steuert so den Abbau bestimmter Proteine, den Zellzyklus, sowie die Ausbildung der extrazellulären Fibronektinmatrix. Es bindet an Elongin B und C und hat einen regulativen Effekt auf die Expression von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren. So ist bei mutiertem VHL-Gen die VEGF-Produktion aktiviert. Durch fehlende Degradierung des Hypoxia-induzierbaren-Faktors kommt es zu unkontrolliertem Wachstum von Gefäßen (Junker 2003, Kamura et al. 1999, Kovacs 1999, Pause et al. 1998, Pomer et al. 1998, Siemeister et al. 1996). Hypermethylierung der VHL-Promotor-Region ist eine zweite Möglichkeit der Inaktivierung dieses Gens. Veränderungen des VHL-Gens treten bei anderen Nierentumoren nicht auf. Bei klarzelligen NZK ohne Inaktivierung des VHL-Gens scheinen Mutationen in Tumorsuppressorgenen auf 3p14-p21 die primäre Rolle in der Tumorgenese zu spielen.

Aber auch bei Tumoren mit Verlust des VHL-Gens ist der Funktionsverlust weiterer TSG auf 3p anzunehmen (Clifford et al. 1998). Inaktivierung beider Allele des VHL-Gens konnte in bis zu 37 % der Fälle nachgewiesen werden (Liu et al. 2005).

Neben dem Verlust der 3p25-p26 (VHL-Gen) und 3p12-p14.2-Regionen (FHIT-Gen) finden sich beim klarzelligen Nierenzellkarzinom auch Verluste in 3p21-p22. Für diesen Chromosomenabschnitt konnte das RASSF1A Tumorsuppressorgen (TSG) bei Bronchial- und Mammatumoren identifiziert werden. Dabei könnte es sich auch um ein für das Nierenzellkarzinom relevante TSG der 3p21.3-Region handeln (Dreijerink et al. 2001). Weitere Tumorsuppressorgene auf 3p14.2 sind das HRCA1 (hereditary renal cancer associated 1), auf 3p12 das NRC-1 (non-papillary renal cell carcinoma 1) und auf 3p25 das OGG1-Gen (Audebert et al. 2000, Lott et al. 1998). Die Translokation t(X;1)(p11.2;q21.2) konnte gehäuft bei Männern beobachtet werden (Meloni-Ehrig 2002).

2.6.1.2. Familiäre Form

Bei den vererbten Formen spielt die von Hippel-Lindau-Erkrankung eine wichtige Rolle. Sie gehört zu den Phakomatosen und ist durch Hämangioblastome des Kleinhirns und der Retina, Pankreaszysten, Phäochromozytome, Nierenzysten sowie durch das Auftreten von Nierenzellkarzinomen charakterisiert. Diese sind prognosebestimmend und stellen in ca. 70 % die Todesursache dar. Es werden Formen ohne Phäochromozytom (VHL-1) von solchen mit Phäochromozytom (VHL-2) unterschieden. Das Syndrom wird durch Keimbahnmutationen im VHL-Tumorsuppressorgen verursacht. Bisher wurden über 100 verschiedene Mutationen identifiziert. Der Genlokus der von-Hippel-Lindau (VHL)-Erkrankung befindet sich in der Chromosom 3p25-26-Region (Friedrich 2001, Latif et al. 1993).

In Familien mit hereditären Nierenzellkarzinomen wurden Translokationen zwischen den Chromosomen 3 und 8, t(3;8)(p14.2;q24.13) beschrieben. Das c-myc Onkogen (8q24.1) gelangt so in die 3p14 Region und spielt auch eine wichtige Rolle beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Auch ein anderes Gen, das TCR 8, ist bei der Tumorgenese beteiligt (Gemmill et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass es zur Fusion des TRC 8 mit dem FHIT-Gens kommt. Andere Untersuchungen bei Patienten mit t(3;8)(14.2;q24.2) fanden in den translozierten Chromosomenabschnitten für verschiedene Gene nur eine geringe Expression. Das dreistufige Modell der Tumorentwicklung (Translokation, Verlust des Chromosoms 3p und Mutation in einem Tumorsuppressorgen) scheint auch bei dieser familiären Form eine wichtige Rolle zu spielen (Rodriguez-Perales et al. 2004). Auch das c-raf-1 Onkogen (3p25) wird auf Chromosom 8 transloziert (Drabkin

et al. 1985, Harris et al. 1986). Weitere Translokationen, die beim familiären Nierenzellkarzinom gefunden werden konnten, sind die Translokationen t(3;11)(p14;q15), t(3;12)(q13.2;q24.19) und t(3;6)(q12;q15). Allen gemeinsam ist die Beteiligung des Chromosoms 3, welches eine Schlüsselrolle bei der Tumorentstehung innehat (Eleveld et al. 2001, Kovacs und Hoene 1988, Pathak et al. 1982). Bei familiärem Nierenzellkarzinom t(2;3)(q35;q21) wird durch die Translokation das DIRC2-Gen (disrupted in renal cell cancer 2) zerstört. Dieses Gen kodiert für ein Transmembranprotein. Untersuchungen bei Patienten mit sporadischen Nierenzellkarzinomen konnten einen Defekt dieses Gens nicht nachweisen. Der Bruchpunkt liegt außerhalb von DIRC2. Auf Chromosom 2 konnte mit dem DIRC3 ein weiteres Gen detektiert werden, welches durch die Translokation getrennt wird (Bonne et al. 2004). In einer polnischen Familie mit 7 Nierenzellkarzinomfällen über 3 Generationen konnte 1999 eine Translokation t(2;3)(q33;q21) nachgewiesen werden. Dadurch kommt es zum Funktionsverlust des DIRC1 Genes (Druck et al. 2001). Chen et al. konnten in einer japanischen Familie mit t(1;3)(q32;q13) Translokation im Bereich der Bruchstelle zwei Gene nachweisen – auf Chromosom 1 NORE1 und auf Chromosom 3 LSAMP. Bei NORE1 handelt es sich um ein Ras-GTP bindendes Protein welches Heterodimere mit dem Tumorsuppressorgen RASSF1 bildet. LSAMP ist ein neuronales Glycoprotein, dass zu den Zelladhäsionsmolekülen gehört. Weitere in der Literatur beschriebene Veränderungen bei hereditären Nierenzellkarzinomen sind Translokationen t(3;4)(p13;p16) sowie t(3;6)(p13;q25), bei denen sich multiple bilaterale Tumoren fanden (Bonne et al. 2004, Kovacs et al. 1989).

Nach Koolen et al. sind durch Nondisjunktion bedingter Chromosomenverlust und somatische Mutation im VHL-Gen wichtige Schritte bei der Entstehung des familiären Nierenzellkarzinoms (Bodmer et al. 2002a, Bodmer et al. 2002b).

2.6.2. Papilläre Nierenzellkarzinome

Nach Kovacs et al. sind papilläre Nierenzelltumoren im Gegensatz zu konventionellen Nierenzelltumoren nicht durch einen Allelverlust, sondern durch Allelduplikationen spezifischer chromosomaler Abschnitte gekennzeichnet. Die häufigsten Alterationen sind Trisomie 7 und 17. Duplikationen der Chromosom-7q31.2-Region (MET-Gen), 7q21.1 (HGF/SF Gen) und 7p12 (EGFR-Gen) können zur Entstehung papillärer NZT führen (Kovacs 1999). Die seltene familiäre Form des papillären Nierenzellkarzinoms (hereditary papillary renal cell carcinoma, HPRCC) ist häufig mit einer Keimbahnmutation des MET-Onkogens assoziiert.

Bei 85 % der papillären NZT konnte der Verlust des Y-Chromosoms nachgewiesen werden. Duplizierung bestimmter Chromosomen (z.B. 2, 7, 8, 12, 17 und 20) sind charakteristisch für embryonale Tumoren. Da sich diese Veränderungen auch gehäuft in papillären NZT finden, ist anzunehmen, dass die überwiegende Zahl dieser Tumoren von embryonalen Resten ausgeht (Kovacs 1999). Eine seltene Form papillärer Tumoren, die eine eosinophile histopathologische Differenzierung besitzt und die vor allem jüngere Patienten betrifft, ist durch eine Translokation zwischen dem Chromosom X(p11.2) und den chromosomalen Regionen 1q43, 1q21, 10q23 und 17q25 charakterisiert. Es kommt zur Fusion eines Transkriptionsfaktors (TFE3), der auf 1q11.2 gelegen ist und dem PRCC- bzw. dem PSF-Gen der Regionen 1q34 bzw. 1q21, wodurch der fast völlige Verlust des normalen TFE3-Genproduktes resultiert. Diese Veränderungen wurden auch bei Sarkomen und Leukämien nachgewiesen (Sidhar et al. 1996).

2.6.3. Chromophobe Nierenzellkarzinome

Spezifische Chromosomenalterationen in chromophoben Nierenzellkarzinomen sind Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21. Dieser Verlust führt zu einer niedrigen Chromosomenzahl von 35-40 (Kovacs 1999).

Neben dem klassischen chromophoben Nierenzellkarzinom wird eine eosinophile Variante beschrieben. Auch hierbei finden sich Verluste der Chromosomen 1, 2, 6, 10 und 17 (Brunelli et al. 2005). Verluste des Chromosoms 3 werden nicht angegeben.

2.6.4. Nierenonkozytome

Durch DNA-Analysen konnten 3 Gruppen von Nierenonkozytomen identifiziert werden. Dabei werden Monosomien des Chromosoms 1 und/oder des Chromosoms 14q, sowie Verlust des Y-Chromosoms beschrieben. Eine weitere Gruppe zeigt eine balancierte Translokation zwischen Chromosom 11q13 und anderen Chromosomen. Die dritte Gruppe weist keine sichtbaren genetischen Alterationen auf (Kovacs 1999).

2.6.5. Sammelrohrkarzinome (Bellini-Duct-Karzinome)

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben zu genetischen Veränderungen beim Sammelrohrkarzinom (Kovacs 1999). Verdorfer et al. berichteten über Verluste der Chromosomen 1p, 2, 9, 11 und 18q sowie Zugewinne der Chromosomen 16 und 20q. Andere Autoren geben zusätzlich Deletionen der Chromosomen 6 und 13, in selteneren Fällen Verluste der Chromosomen 8, 14, 15 sowie des Chromosoms 22 an (Fuzesi et al. 1992, Verdorfer et al. 1998).

2.6.6. Metanephrogene Adenome

Kovacs et al. beschrieben bei Metanephrogenen Adenomen in 56 % der Fälle Alterationen der Chromosom-2p-Region (Kovacs 1999). Metanephrogene Adenome haben morphologische Ähnlichkeit mit papillären Nierenzellkarzinomen. Zugewinne der Chromosomen 7 und 17 sowie Verluste des Y-Chromosoms, die als typische Veränderungen in papillären Nierenzelltumoren gelten, konnten in metanephrogenen Adenomen nicht gefunden werden (Brunelli et al. 2003).

3. Zielstellung

Im Rahmen früherer Studien an der Urologischen Universitätsklinik der FSU Jena wurde untersucht, ob bereits im Primärtumor genetische Veränderungen auf das Metastasierungspotential hinweisen. Es konnte durch CGH-Analyse gezeigt werden, dass spezifische Chromosomenalterationen in metastasierten Tumoren signifikant häufiger als in nichtmetastasierten Tumoren auftreten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, kritische chromosomale Regionen, die mit der Metastasierung beim Nierenzellkarzinom assoziiert sind, weiter einzugrenzen.

Hierzu wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

1. Analyse genetischer Veränderungen spezifischer Regionen auf den Chromosomen 9 und 18 unter Verwendung der Mikrosatellitenmarkeranalyse (MSA)
2. Korrelation der nachgewiesenen Mikrosatellitenmarkerveränderungen zur Metastasierung unter besonderer Berücksichtigung der klarzelligen Nierenzellkarzinome
3. Analyse der chromosomalen Veränderungen mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) in Korrelation zur Metastasierung
4. Vergleich der mit Hilfe der MSA und der CGH identifizierten genetischen Veränderungen

4. Material und Methode

4.1. Patientenauswahl

4.1.1. Patientenzahl und Untersuchungszeitraum

Für die vorliegende Studie wurden 40 Tumornephrektomiepräparate von Patienten untersucht, die sich im Zeitraum von 1994 bis 1998 in der Urologischen Universitätsklinik einer operativen Therapie unterzogen. Dabei entwickelten 21 Patienten Metastasen, bei 19 Patienten bestand auch nach mindestens 36 Monaten kein Anhalt für Metastasierung. Die Patienten waren mit der molekulargenetischen Untersuchung der Gewebeproben einverstanden.

4.1.2. Geschlechts- und Altersverteilung

Von den 40 untersuchten Patienten waren 23 Männer (57,5 %) und 17 Frauen (42,5%). Die Altersverteilung reichte von einem Minimum von 27 Jahren bis zu einem Maximum von 75 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 59,8 Jahre. Die Frauen waren mit 60,1 Jahren im Durchschnitt geringfügig älter als die Männer (59,6 Jahre).

	Alle Tumoren		
	Männer (n=23)	Frauen (n=17)	Gesamt (n=40)
Minimum	51	27	27
Maximum	70	75	75
Mittelwert	59,6	60,1	59,8
Standardabweichung	6,1	12,0	9,0

Tabelle 6: Altersverteilung der ausgewählten Patienten (in Jahren)

In der Gruppe der Patienten mit metastasierten Tumoren waren Männer mit 85,7 % deutlich häufiger vertreten als Frauen (14,3 %). Zum Zeitpunkt der Operation lag das Alter bei durchschnittlich 58,5 Jahren. Auch bei den Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren waren die beiden Geschlechter ungleichmäßig repräsentiert (Männer 26,3 % vs. Frauen 73,7 %). Das Durchschnittsalter lag hier mit 61,3 Jahren höher als in der Vergleichsgruppe (58,5 Jahre). Eine Übersicht gibt Tabelle 7.

	metastasierte Tumoren			nichtmetastasierte Tumoren		
	Männer (n=18)	Frauen (n=3)	Gesamt (n=21)	Männer (n=5)	Frauen (n=14)	Gesamt (n=19)
Minimum	51	47	47	53	27	27
Maximum	70	66	70	69	75	75
Mittelwert	58,6	58,0	58,5	63,2	60,6	61,3
Standard- abweichung	5,6	8,0	6,0	6,5	12,7	11,4

Tabelle 7: Altersverteilung der ausgewählten Patienten (in Jahren)

4.2. Methoden

4.2.1. Gewinnung der Gewebeproben

Nach der Tumornephrektomie wurden aus der vom Tumor befallenen Niere Tumor- und Normalgewebe gewonnen. Die Aufbewahrung dieser Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C in der klinikinternen Tumorbank. Aus den Gefrierproben wurden 5-8 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Die Markierung der Areale mit hohem Tumoranteil erfolgte unter dem Mikroskop, um die Kontamination mit Normalgewebe weitgehend zu vermeiden. Zum Entfernen der Deckgläschen wurden die Objektträger etwa 4-6 Stunden in Aqua dest. inkubiert. Das anschließend mittels Lanzette abgelöste Material wurde, wie auch die Normalgewebeproben, in 180 μl ATL-Puffer der Firma Qiagen gegeben.

4.2.2. DNA-Isolation

Auch bei den weiteren Schritten der DNA-Gewinnung fand das kommerzielle QIAmp Tissue Kit[®] Verwendung. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 20 μl Proteinase und die anschließende Schüttelinkubation bei 56°C für ca. 45 min. Nach Hinzufügen von 200 μl AL-Puffer wurde dieser Ansatz gründlich durchmischt und erneut bei 70°C für 10 min inkubiert. Die Lösung wurde mit 200 μl Ethanol (96%) versetzt und nach gründlichem Schütteln auf eine QIAmp Spin Column aufgetragen. Mit einer Laborzentrifuge (Labofuge 400e, Hereus Instruments) wurde für 2 min bei 8000n^{-1} zentrifugiert und der Überstand verworfen. In den folgenden Schritten wurde das nun im Filtersystem befindliche Material zweimal mit Puffern gewaschen. Hierfür kamen jeweils 500 μl Puffer AW1 und AW2 zum Einsatz. Nach Zugabe von AW1 wurde für 2 min bei 8000n^{-1} , nach Zugabe von AW2 für 3 min bei 14000n^{-1} zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die im QIAmp Spin Column verbliebene DNA löste sich nach zweimaliger Zugabe von 150 μl AE-Puffer, Inkubation bei 70°C für 5 min und anschließender Zentrifugation mit 8000n^{-1} für 1 min. Das Filtrat wurde in einem 1,5 ml fassenden Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die darin enthaltene DNA-Konzentration wurde durch Extinktion mit dem Photometer Gene Quant II (Pharmacia Biotech) ermittelt.

4.2.3. Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die vergleichende genomische Hybridisierung wurde 1992 von Kallioniemi et al. entwickelt. Dieses Verfahren ermöglicht den Nachweis von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten, ohne Kenntnis eventuell betroffener Genorte. Die Degenerate Oligonucleotide-primed (DOP)-PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation des kompletten Genoms. Wird sie der Vergleichenden genomischen Hybridisierung vorangestellt, so können auch geringe DNA-Mengen für die molekulargenetischen Untersuchungen genutzt werden. Im nächsten Schritt wird die Tumor-DNA mit Biotin, sowie die Kontroll-DNA mit Digoxigenin markiert und auf normale Metaphasenplatten hybridisiert. Diese konkurrieren dann um die vorhandenen Bindungsplätze. Durch Zugabe von (unmarkierter) Cot1-DNA können hochrepetitive Sequenzen abgesättigt werden. Im Anschluß werden die Proben gewaschen und mit Avidin-FITC zur Detektion der Biotin-markierten Tumor-DNA, sowie mit Anti-Digoxigenin-Rhodamin zum Visualisieren der Digoxigenin-markierten Normal-DNA gefärbt. Die Fluoreszenzintensitäten entlang des Chromosoms zeigen das Verhältnis der Tumor-DNA zur Kontroll-DNA. So spricht ein Überwiegen der grünen Fluoreszenz (Tumor-DNA) für Amplifikationen, Deletionen werden durch ein intensiveres rotes Fluoreszenzsignal abgebildet. Zur Abschätzung des Verhältnisses der Signalintensitäten werden die Metaphasenplatten aufgenommen und die Signalintensitäten mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungssystems ausgewertet.

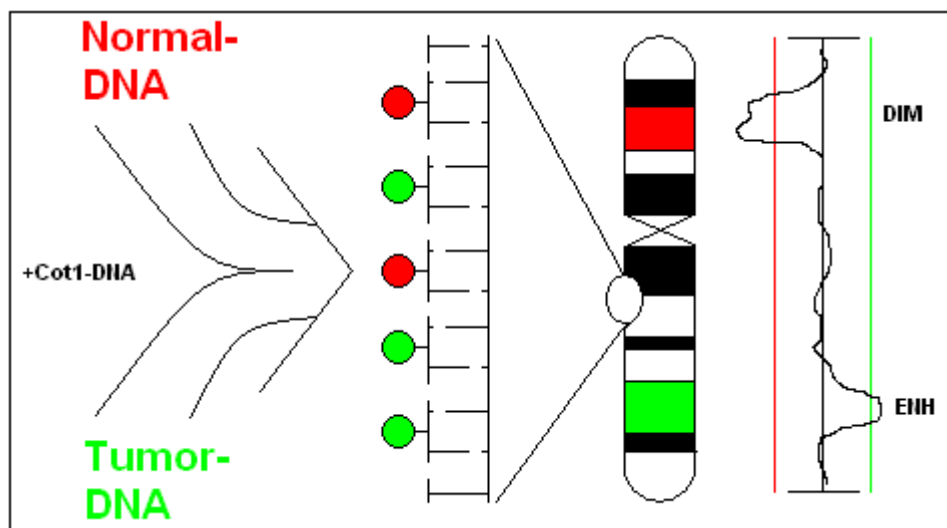


Abbildung 2: Prinzip der CGH (DIM: diminution= Verlust von genetischem Material;
ENH: enhancement= Zugewinn an genetischem Material)

4.2.4. DOP-PCR

Im Folgenden wird der Ablaufplan am Beispiel einer Probe dargestellt.

Für diese Reaktion werden 4 verschiedene Reagenzienmischungen benötigt. Lösung 1 enthält 5,1 µl destilliertes Wasser, 0,9 µl Sequenase Puffer (Amersham, Life Science), 0,9 µl 5 µM DOP-Primern und 0,6 µl dNTPs (GeneAmp dNTPs, Perkin Elmer).

In Lösung 2 werden für jeden Ansatz 2,6 µl Sequenase Lösungspuffer und 0,375 µl Sequenase (beides Amersham Life Science) gemischt. Für Lösung 3 verwendet man pro Ansatz 35,2 µl destilliertes Wasser, 5 µl Stoffel-Puffer (Perkin Elmer), 4,4 µl dNTP's, 1,375 µl DOP-Primer und 5 µl Magnesiumchlorid. (2,5 mM). Der Lösung 4 muss 4,375 µl destilliertes Wasser, 0,6 µl Stoffelfragment-Puffer, 0,6 µl Magnesiumchlorid (2,5 mM) sowie 0,6 µl Stoffel Fragment Taq-Polymerase (1U/µl) zugefügt werden. Um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, wurde bei jeder DOP-PCR eine Negativkontrolle mitgeführt. Im nächsten Schritt werden die benötigten Reaktionsgefäße mit 1 µl DNA-Verdünnung (entsprechend der zuvor mit dem Photometer bestimmten Konzentration) und 5 µl Lösung 1 befüllt und in einem Thermo-Cycler (PTC-200, Peletier Thermo Cycler, MJ Research Biozym) plaziert. Die Amplifikation erfolgt in den ersten 8 Zyklen mithilfe der ThermoSequenase, in den folgenden 30 Zyklen wird die AmpliTaq-Polymerase (Stoffelfragment) eingesetzt. Da die Sequenase thermoinstabil ist, muss sie bei jedem Reaktionszyklus erneut zugesetzt werden. Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 3 dargestellt.

DOP-PCR-Reaktionsablauf			
	Temperatur	Dauer	Reaktionsschritt
1	96 °C	5'	Denaturierung
2	30 °C	2'20"	Hinzufügen von 0,24 µl Lösung 2
3	37 °C	2'	
4	95 °C	1'	Denaturierung
5	Wiederholung ab Schritt 2 (7x)		
6	30 °C	2'20"	Hinzufügen von 45 µl Lösung 3
7	95 °C	1'	Denaturierung
8	56 °C	2'20"	Hinzufügen von 5 µl Lösung 4
9	72 °C	2'	Extension
10	94 °C	1'	Denaturierung
11	56 °C	1'	Annealing
12	72 °C	2'	Extension
13	Wiederholung ab Schritt 10 (31x)		
14	72 °C	10'	Extension
15	4 °C	bis Entnahme	Kühlung des Reaktionsproduktes

Abbildung 3: Reaktionsablauf der DOP-PCR

4.2.5. Kontrollelektrophorese

Nach der DOP-PCR wird das Reaktionsprodukt hinsichtlich der Fragmentlänge kontrolliert. Diese sollten für die CGH zwischen 200 und 1000 Basenpaaren liegen. Das hierbei verwendete 2%ige Agarosegel setzt sich aus 1 g Agarose und 50 ml TBE-Puffer (amresco) zusammen. In jede Geltasche wurden 5 µl Probe, 5 µl TBE-Puffer und 4 µl Load-Mix eingefüllt. Zur Bestimmung der Fragmentlänge kam eine Mischung aus 1 µl Standard (Boehringer VIII), 9 µl TBE-Puffer und 4 µl Load-Mix zum Einsatz. Nach elektrophoretischer Auftrennung (20 min bei 150 V und 150 mA) und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid (Verdünnung 1:30 in 10 %igem TBE-Puffer) konnten die Fragmente im UV-Licht mit den Standard verglichen werden. Bei erkennbaren Verunreinigungen wurde die DOP-PCR wiederholt.

4.2.6. Markierung

Nach der DOP-PCR werden Tumor- und Kontroll-DNA mit unterschiedlichen Markierungen versehen. Dadurch können Chromosomenveränderungen nach der Vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) beurteilt werden. Bei der direkten Markierung werden Nukleotide mit daran gebundenen Fluorochromen in die DNA eingebaut. Bei der hier durchgeführten indirekten Markierung sind an den Nukleotiden Marker gebunden, die in einer zweiten Reaktion als Bindungsort für fluorochromtragende Moleküle dienen.

Als Marker wurde für die Tumorproben Biotin-16-dUTP, für die Normal-DNA Digoxigenin-11-dUTP (beides Boehringer Mannheim) verwendet.

2,5 µl PCR-Produkt wurden mit 23 µl einer Lösung vermischt, deren Zusammensetzung im Folgenden aufgeführt ist: 29,5 µl H₂O; 2,5 µl Replitherm-Puffer; 5 µl dNTP; 5µl Biotin-16-dUTP/Digoxigenin-11-dUTP; 2,5 µl DOP-Primer; 5 µl MgCl₂ und 0,3 µl AmpliTaq-Polymerase.

Den Reaktionsablauf zeigt Abbildung 4.

Markierung			
	Temperatur	Dauer	Reaktionsschritt
1	95 °C	3'	Denaturierung
2	94 °C	1'	"
3	56 °C	1'	Annealing
4	72 °C	2'	Extension
5	Wiederholung ab Schritt 3 (19x)		
6	72 °C	5'	Extension
7	4 °C	bis Entnahme	Kühlung des Reaktionsproduktes

Abbildung 4: Reaktionsablauf bei der indirekten Markierung

Nach Abschluß der Reaktion wurden die Proben auf ein Filtersystem gegeben und bei 2600 U/min 2 min zentrifugiert. Ungebundene Nukleotide konnten so entfernt werden.

4.2.7. Hybridisierung

Für die Hybridisierung werden speziell auf Objektträgern präparierte Metaphaseplatten benötigt. Hierfür verwendet man normales Nierengewebe, welches in 25 ml-Zellkulturflaschen angezüchtet wird. Durch Zugabe von 100 µl Colchizin kann man den Zellzyklus synchronisieren und die Zellen in der Metaphase fixieren. Anschließend wurden sie mit 2 ml eines EDTA-Gemisches abgelöst und bei 37 °C 20 min mit 7 ml KCL zur hypotonen Behandlung gemischt. Zur Vorfixierung eignet sich 1 ml Fixativ (75 % Methanol, 25 % Eisessig). Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Fixierung 3-mal mit 6 ml Fixativ wiederholt. Die so behandelten Zellen wurden auf Objektträger getropft und konnten nach ca. 10-tägigem Altern für die Hybridisierung verwendet werden. Die chromosomale DNA auf den Objektträgern wurde 2 min bei 70 °C in Formamid (70 %) denaturiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 85 und 100 %) bei –20 °C dehydriert.

Die unterschiedlich markierten Normal- und Tumor-DNA (je 1 µl) wurden zusammen mit unmarkierter Cot1-DNA (70 µl), 2 Vol. Ethanol und $\frac{1}{20}$ Vol. Natriumacetat vermischt, anschließend für 30 min bei –70 °C ausgefällt. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 n^{-1} , der Überstand wurde verworfen und die Probe luftgetrocknet. Das DNA-Präzipitat wurde in 15 µl Hybridisierungslösung (2 g Dextransulfat, 5 ml deionisiertes Formamid, 1 ml Phosphatpuffer, 1 ml 20xSSC, 3 ml Aqua bidest.) gelöst und 5 min bei 70 °C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min auf –20 °C abgekühlt, danach bei 37 °C vorinkubiert und auf den Objektträger aufgetropft. Im letzten Schritt erfolgte der Verschluss von Objektträger und Deckglas mit Hilfe von Fixogum. Danach wurden die Proben zur Hybridisierung für 2-4 Tage bei 37 °C in eine feuchte Kammer gegeben.

4.2.8. Detektion

Bei der hier verwendeten indirekten Markierung erfolgt der Nachweis der hybridisierten DNA durch die Bindung von sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern an Digoxigenin bzw. von Avidin-FITC an Biotin und die Gegenfärbung mit 4,6-Diamidino-2-Phenyl-Indol (DAPI). Dazu wurden zunächst die Deckgläschen entfernt und die Objektträger mehrfach gewaschen: zweimal 10 min in 50 %igem Formamid bei 42 °C, einmal 10 min in 2x SSC bei 42 °C und einmal 2 min in 4x SSC/0,2x Tween. Zum Abblocken unspezifischer Antikörperbindungen wurden anschließend pro Objektträger 100 µl 5%-iges BSA in 4x SSC/Tween aufgetragen und bei 37°C in der feuchten Kammer für 20 min inkubiert. Nun erfolgte der eigentliche Detektionsschritt mit 500 µl 5%-iger BSA-

Lösung, der 1 µl Avidin-FITC (Verd. 1:500) und 25 µl Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Verd. 1:20, beides Oncor) zugegeben worden sind. 100 µl von dieser Lösung wurden pro Objektträger aufgetragen und anschließend für 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Objektträger noch zweimal je 5 min in 4x SSC/Tween bei Raumtemperatur gewaschen und mit 20 µl DAPI/Antifade (Oncor) gefärbt.

4.2.9. Auswertung

Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss) und einer CCD Kamera mit FITC, TRITC und DAPI spezifischen Filtersystemen. Von jeder Probe wurden mindestens 15 Metaphaseplatten computergestützt mit Hilfe des ISIS 3- Programms der Firma Metasystems ausgewertet. Aus den Karyogrammen aller ausgewerteten Metaphaseplatten berechnet die Software ein mittleres Fluoreszenzprofil. Daraus werden keine absoluten Intensitätswerte, sondern das Rot-Grün-Verhältnis ermittelt. Bei Überwiegen eines dieser Signale können Rückschlüsse auf Zugewinne oder Verluste auf Seiten der Tumor-DNA gezogen werden. Zeigt diese keine genetischen Aberrationen, so beträgt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten 1,0. Das grüne Fluoreszenzsignal überwiegt im Bereich von Amplifikationen, da hier die Tumor-DNA im Vergleich zur normalen DNA überrepräsentiert ist. Bei Deletionen dominiert die Kontroll-DNA und das rote Signal ist stärker.

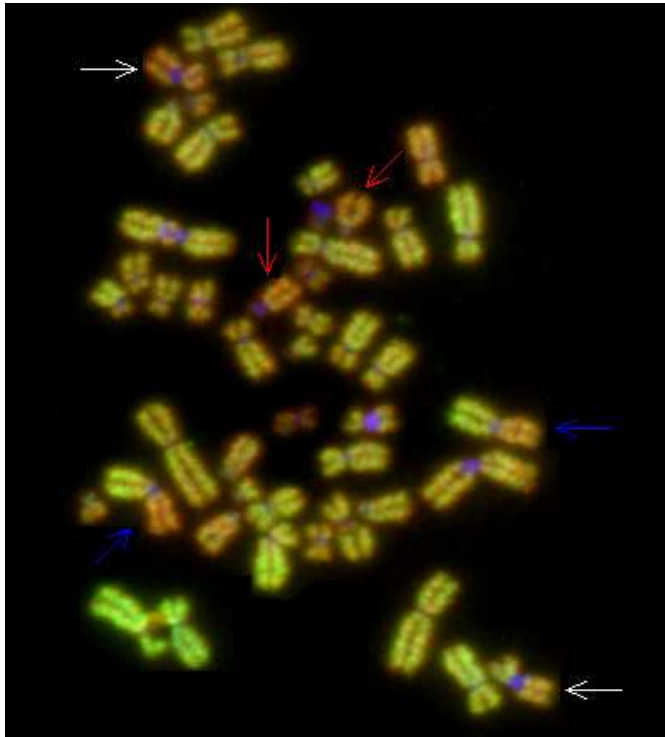


Abbildung 5a: Metaphaseplatte des Falls 121 P1. Die Verschiebung des Rot-Grün-Fluoreszenzverhältnis ist bereits unter dem Mikroskop erkennbar. Exemplarisch sind die Chromosomen 3, 9 und 18 markiert. Die Chromosomen 3 (blauer Pfeil) zeigen ein Überwiegen der roten Fluoreszenz der normalen Kontroll-DNA, was für Deletionen der Tumor-DNA auf dem p-Arm spricht. Zugewinne an Tumor-DNA stellen sich auf 3q durch Überwiegen der grünen Fluoreszenz dar. Weiterhin sind die Chromosomen 9 (weißer Pfeil) sowie 18 (roter Pfeil) markiert. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe einer digitalen Bildverarbeitung.

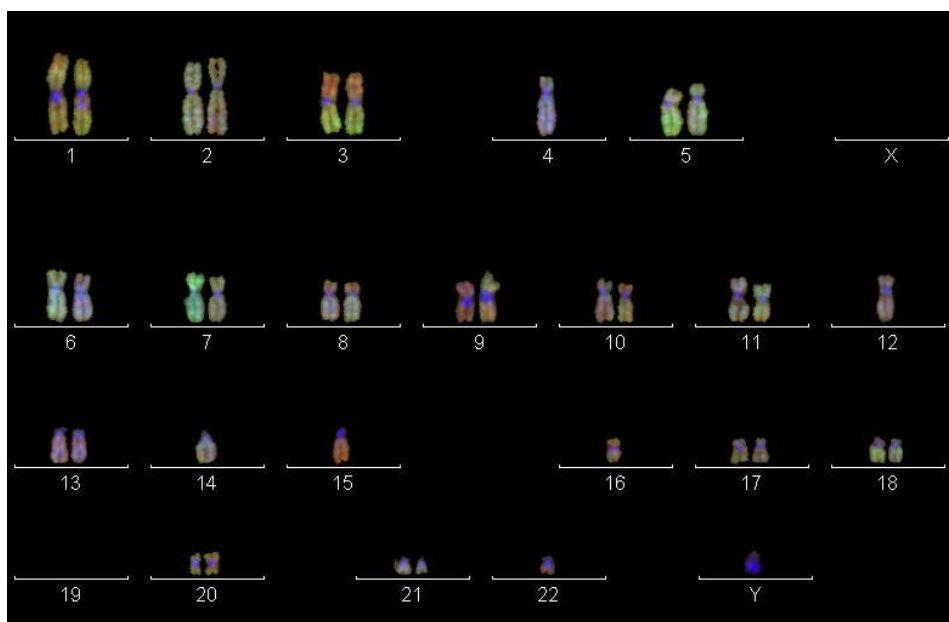


Abbildung 5b: Sortieren der Chromosomen

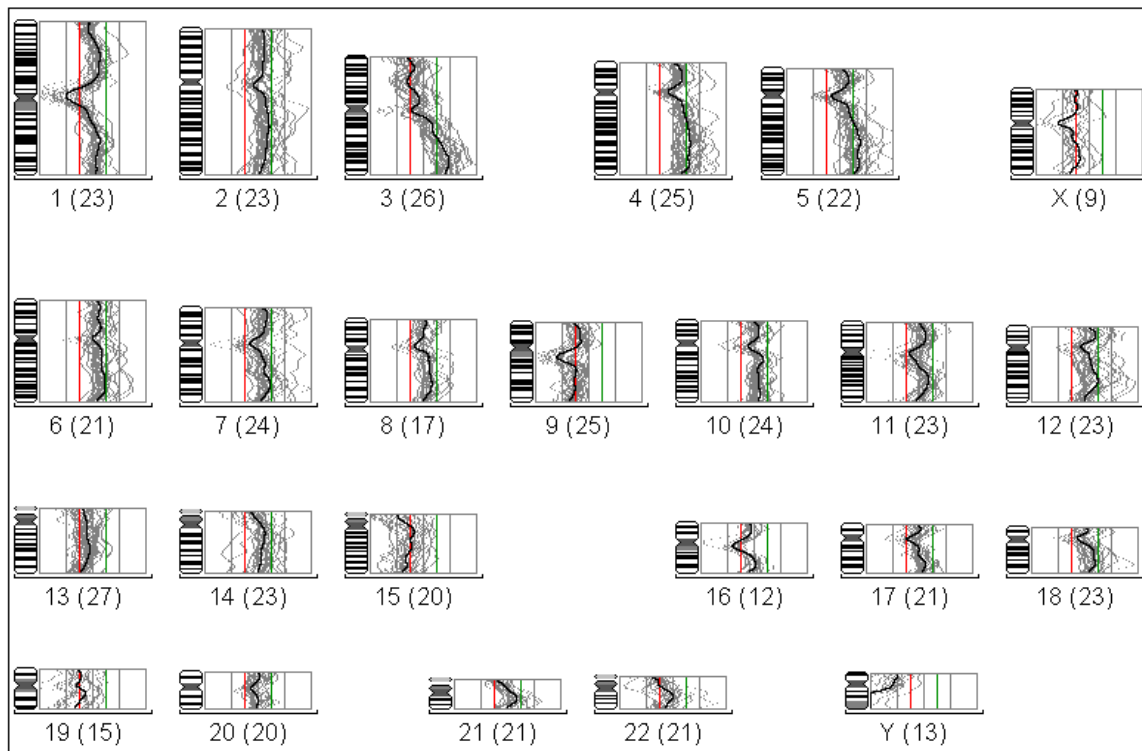


Abbildung 5c: Fall 121P1. Darstellung des mittleren Fluoreszenzprofils aller ausgewerteten Metaphasenplatten. Hinter der Nummer der Chromosomen wird in Klammern die Anzahl der ausgewerteten Chromosomen angegeben. Zugewinne und Verluste zeigen sich in einem Abweichen des Summenprofils von der Mittellinie in Richtung Grün bzw. Rot.

4.2.10. Mikrosatellitenmarkeranalyse

Die Mikrosatellitenmarkeranalyse ermöglicht auf Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR) die Detektion genetischer Alterationen. Grundlage hierfür ist die Existenz kleiner repetitiver DNA-Abschnitte (Mikrosatelliten). Diese sind hochpolymorph und über alle Chromosomen eines Genoms verteilt. Durch den Einsatz synthetischer Oligonukleotide (Primer), welche gegenseitig orientiert sind und die Mikrosatelliten-DNA flankieren, können spezifische Abschnitte eines Chromosoms vervielfacht werden. Für die Reaktion ist die Zugabe von Desoxyribonukleotridtriphosphaten sowie einer thermostabilen DNA-Polymerase erforderlich. In einem dreistufigen Reaktionszyklus erfolgen Denaturierung in DNA-Einzelstränge, Primerhybridisierung (Annealing) sowie anschließende Synthese entsprechend der Matrize. Nach jedem Zyklus liegt die DNA als Doppelstrang vor. Bei jedem folgenden Zyklus wird die DNA-Menge verdoppelt. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass sehr geringe DNA-Mengen für die Untersuchung ausreichen. Ein Nachteil der Mikrosatellitenmarkeranalyse ist die Verfälschung des Ergebnisses durch Kontamination der Probe mit Fremd-DNA. Aus diesem Grund sollte jede PCR kontrolliert werden. Einen Überblick gibt Abbildung 6.

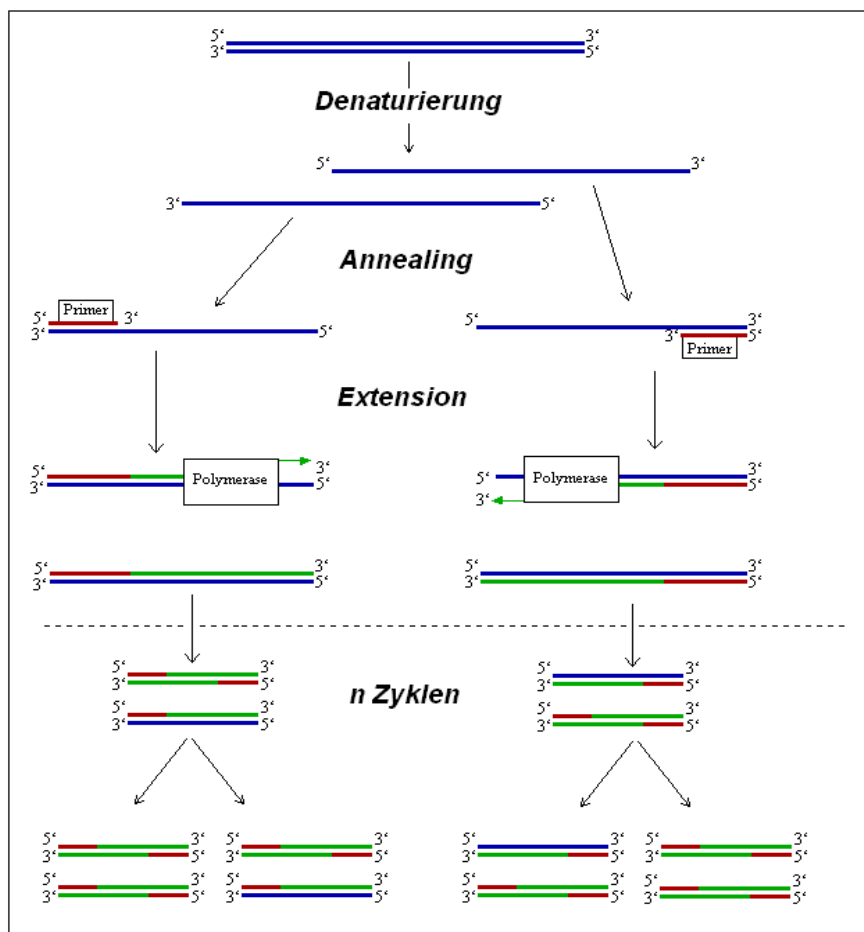


Abbildung 6: Prinzip der PCR

Die Ziel-DNA wird dabei so angereichert, dass die Auftrennung der Allele mittels Elektrophorese möglich ist. Ein Marker ist jeweils am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Visualisierung erfolgt mittels Laserdetektion im automatischen Sequenzer. Zur Auswertung der erhobenen Daten kommt eine spezielle Software zum Einsatz. Anhand der Intensitätsunterschiede der Banden kann auf das Fehlen eines Chromosomenabschnitts (LOH) bzw. Mikrosatelliteninstabilitäten (Shift) geschlossen werden (Lottspeich und Zorbas 1998, Munk 2001).

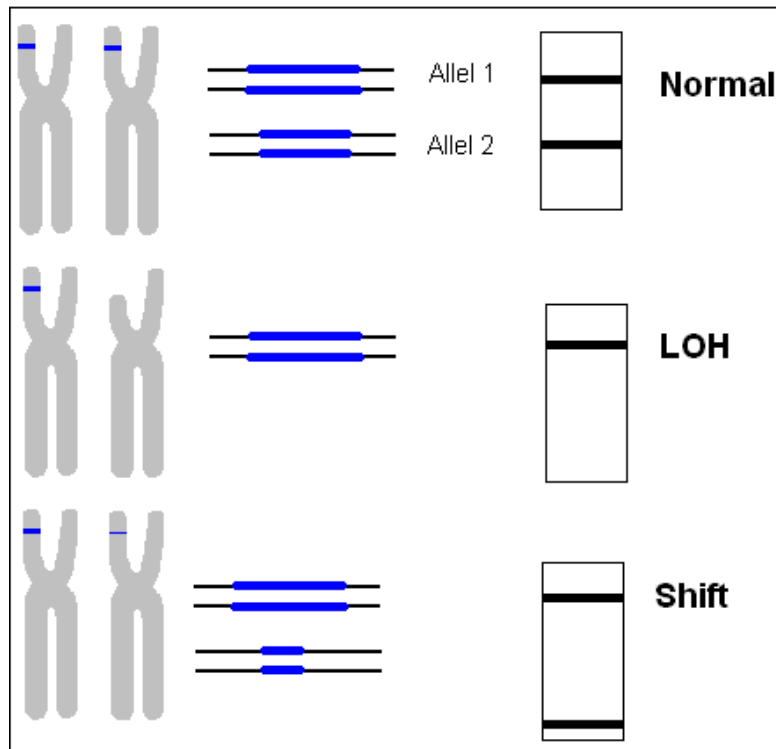


Abbildung 7: Mikrosatellitenmarkeranalyse (Bild oben: Normal- mütterliches und väterliches Allel sind unterschiedlich lang, es erscheinen in der PCR 2 Banden; Bildmitte: Verlust der Heterozygotie (LOH), es ist nur eine Bande erkennbar; Bild unten: Mikrosatelliteninstabilität (Shift), ein Allel ist verkürzt oder verlängert, es bilden sich 2 Banden ab, wobei eine Bande im Vergleich zur Normal-DNA versetzt ist).

4.2.11. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde in Eppendorf-Gefäßen mit einem optimalen Reaktionsvolumen von 15 µl gearbeitet. Die erforderliche DNA-Menge pro Reaktionsgefäß betrug 20 ng.

Entsprechend der vorher ermittelten Konzentration wurde mit Aqua dest. aufgefüllt.

Weiterhin wurden 7,5 µl Puffer (Puffer F, Master AmpTM), 0,66 µl Primermix (Konzentrationen siehe unten folgende Tabelle) sowie 0,1 µl hitzestabile Polymerase (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Diagnostics) in einer Konzentration von 3,5 U/µl zugesetzt.

Die Untersuchung der Chromosomen 9 und 18 erfolgte mit jeweils 6 verschiedenen Markern. In der folgenden Tabelle sind die eingesetzten Mikrosatellitenmarker aufgelistet. Jeweils ein Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (IRD 800; MWG-Biotech, Ebersberg, Germany).

Marker		Lokus	Konzentration (in pmol/µl)-Primer markiert	Konzentration (in pmol/µl)-Primer nicht markiert
L1	D9S937	9p24.1	153	66
L2	D9S925	9p23	116	19
L3	D9S1678	9p13	13	145
L4	D9S320	9p24.1	155	28
L5	D9S1118	9p13	47	58
L6	D9S921	9p23	85	113
M1	D18S462	18q23	87	24
M2	D18S55	18q22.1	41	32
M3	D18S61	18q22.3	99	37
M4	D18S66	18q12.1	71	30
M6	D18S390	18q22.3	114	49
M7	D18S541	18q21	49	39

Tabelle 8: Verwendete Mikrosatellitenmarker (L1-L6: Chromosom 9 / M1-M7: Chromosom 18)

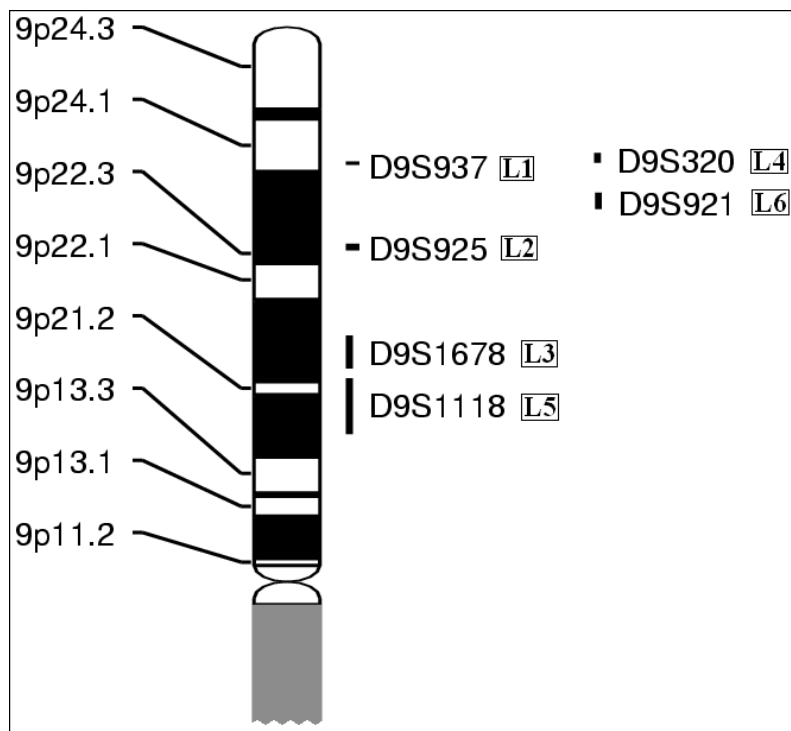


Abbildung 8a: Lage der mit den einzelnen Marker untersuchten Chromosomenabschnitte des Chromosoms 9

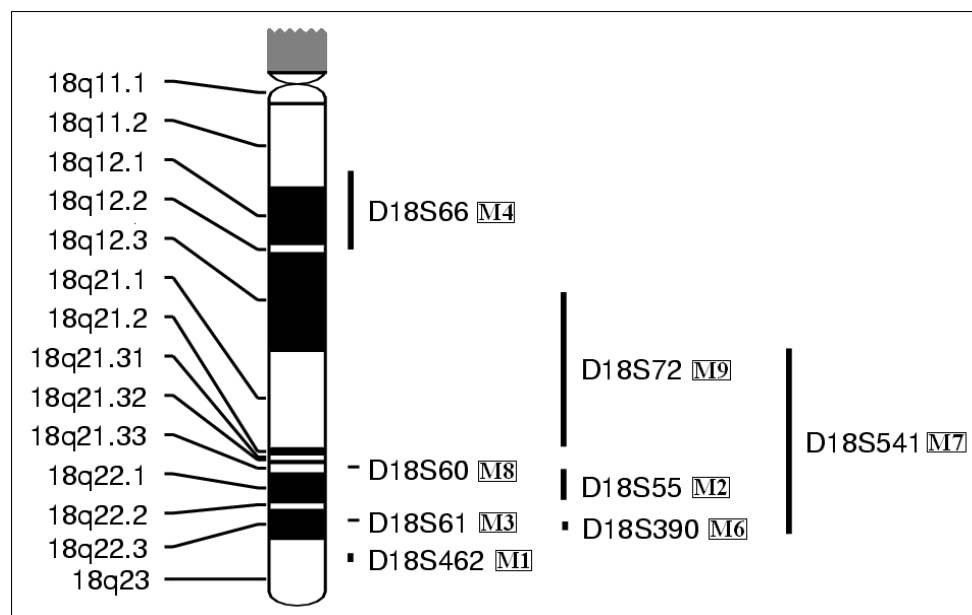


Abbildung 8b: Lage der mit den einzelnen Marker untersuchten Chromosomenabschnitte des Chromosoms 18

Vor dem Einsetzen in die vollautomatischen Thermoblocks wurden die Reagenzien gut durchmischt und zentrifugiert. Dadurch sollte eine gleichmäßige Verteilung aller Zusätze erreicht werden. Einen Überblick über den Reaktionsablauf gibt Abbildung 9.

PCR-Reaktionsablauf			
	Temperatur	Dauer	Reaktionsschritt
1	80 °C	bis Temperatur erreicht	Vorheizen der Blöcke
2	94 °C	5'	Denaturierung
3	94 °C	30''	"
4	58 °C	35''	Annealing
5	72 °C	30''	Reaktionszeit
6	Wiederholung ab Schritt 3, in der Regel 25-35 Zyklen bei Normal-DNA sowie 30-45 Zyklen bei Tumor-DNA		
7	72 °C	5'	Annealing
8	4 °C	bis Entnahme	Kühlung des Reaktionsproduktes

Abbildung 9: Reaktionsablauf bei der PCR

4.2.12. Gel-Elektrophorese

Die Trennung des Reaktionsproduktes erfolgte mittels Polyacrylamidgel im automatischen DNA-Sequenzer (4200 Gene Reader, LI-COR Inc.). Das verwendete Elektrophoresegel setzt sich aus 18 ml SequaGelXR-Monomerkonzentrat, 4 ml SequaGel Complete Buffer (National Diagnostics) und 170 µl 10 %igem Ammoniumpersulfat zusammen. Nach ca. 45 min war das Gel polymerisiert und konnte verwendet werden. Dazu wurde es in einen Behälter mit Pufferlösung getaucht. Dieser Puffer setzt sich aus 162 g TRIS, 27,5 g BOR und 9,3 g EDTA gelöst in 1 l Aqua dest. zusammen. Die hier beschriebene Mischung ergibt einen 10 %igen Puffer, der für die Elektrophorese 1 %ig verwendet wurde. Zur Reinigung des Gels wurde eine Vorlaufzeit von ca. 45 min gewählt. Danach konnten die Proben (je 15 µl) aufgetragen werden. Diese wurden vorher mit einem Laufpuffer im Verhältnis 1+1 gemischt. Dieser besteht aus Formamid (10 ml), Bromphenolblau (10 ml) und EDTA (200 ml). Um eine gute Trennung der DNA zu erreichen, wurden die Proben vor dem Einfüllen in die Geltaschen 5 min im vollautomatischen Thermoblock bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Steuerung des DNA-Sequenzers erfolgt computergestützt mit Base ImagIR™2.3 Version 4.0. Die Auswertung der aufgezeichneten Ergebnisse und Intensitätsmessung der Banden zueinander erfolgte über eine Gauss'sche Verteilung (area under the curve) mit RFLP scan Version 3 von CSP Inc..

4.2.13. Statistische Berechnung

Um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen dem Auftreten von Chromosomenaberrationen bei metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren vorliegen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Als signifikant galt ein Likelihood-Quotient $<0,05$. Zur Berechnung wurde das Statistikprogramm „SPSS für Windows“ genutzt.

5. Ergebnisse

Die nach der Tumornephrektomie resezierten Gewebeproben wurden in der Tumordatenbank der Urologischen Universitätsklinik für die spätere molekularzytogenetische Analyse archiviert. Weiterhin erfolgten die histologische Untersuchung und Klassifikation durch das Institut für Pathologie der FSU Jena.

5.1. Histologie

Von den 40 untersuchten Tumorherden waren 31 klarzellig (78 %), 4 chromophob (10 %), 3 chromophil (8 %). Ferner fand sich ein Adenokarzinom (3 %), welches den metastasierten Tumoren zugeordnet werden konnte. Bei einem Herd war die Klassifikation nicht bekannt. Chromophile Karzinome waren häufiger in der Gruppe der nichtmetastasierten Tumoren vertreten (nichtmetastasiert 2 Fälle=11 % vs. metastasiert 1 Fall=5 %). Chromophobe Neubildungen waren häufiger bei den metastasierten Tumoren vertreten (nichtmetastasiert 1 Fälle=5 % vs. metastasiert 3 Fall=14 %). Klarzellige Tumoren waren in beiden Gruppen etwa gleichhäufig repräsentiert (nichtmetastasiert 15 Fälle=79 % vs. metastasiert 16 Fall=76 %).

Einen Überblick über die prozentuale Verteilung der histologischen Befunde bei den metastasierten und nicht metastasierten Tumoren geben die Abbildungen 10a und 10b.

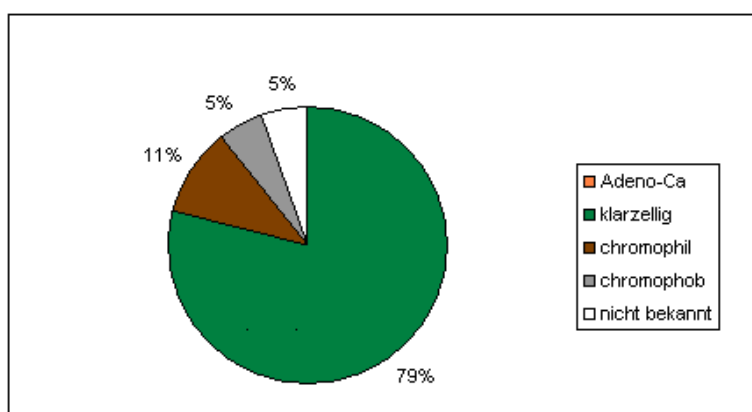


Abbildung 10a: Häufigkeitsverteilung der histologischen Befunde der nichtmetastasierten Tumoren

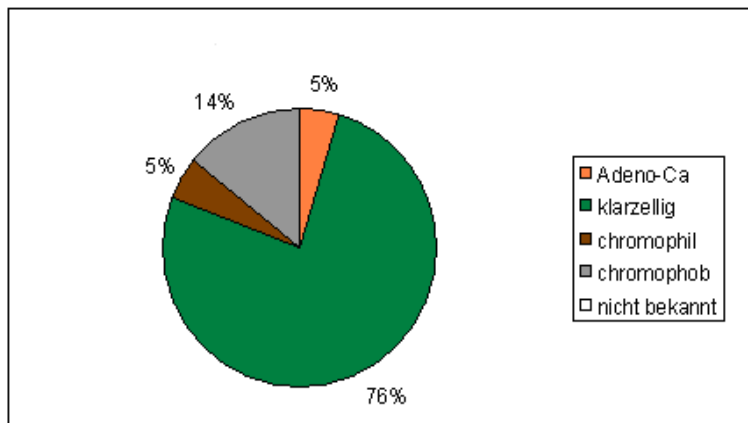


Abbildung 10b: Häufigkeitsverteilung der histologischen Befunde der metastasierten Tumoren

5.2. Tumorstadium und Tumorgrading

Die Tumoren wurden entsprechend der TNM-Klassifikation der UICC von 1997 eingeteilt. Von den untersuchten Tumoren befanden sich 6 (15 %) im T1-Stadium, 17 (42,5 %) der Tumoren wurden als T2 eingeordnet, 9 (22,5 %) Tumoren lagen im T3a und 6 (15 %) im T3b Stadium vor. Ein Tumor (2,5 %) war als T4 klassifiziert. Bei einem weiteren Tumor (2,5 %) war das Stadium nicht bekannt.

Die prozentuale Verteilung des Tumorstadiums bei den metastasierten und nicht metastasierten Tumoren wird in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt.

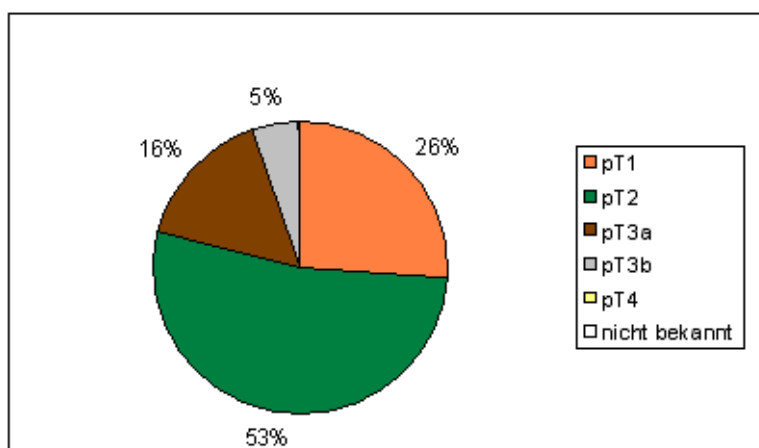


Abbildung 11a: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien bei den nichtmetastasierten Tumoren

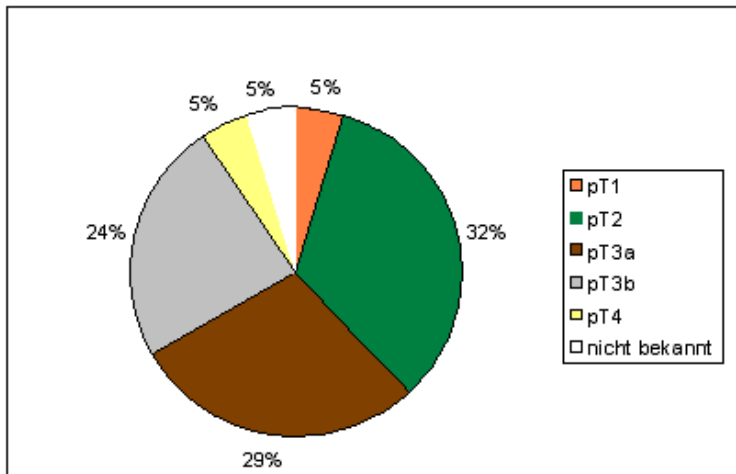


Abbildung 11b: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien bei den metastasierten Tumoren

Von den 40 Tumorherden waren 7 (17,5 %) als gut differenziert (G1) eingeschätzt, 30 (75 %) sind mittelgradig differenziert (G2) und ein Tumor (2,5 %) ist gering differenziert. Bei 2 Tumoren (5 %) fehlt die Angabe des Differenzierungsgrades. Über die prozentuale Verteilung bei den metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren geben die folgenden Diagramme einen Überblick.

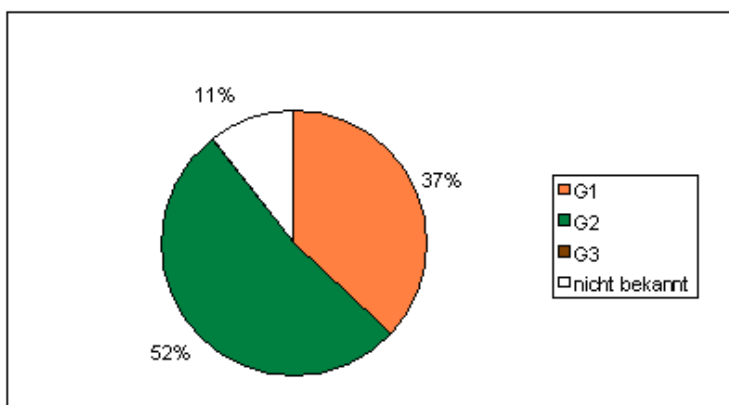


Abbildung 12a: Differenzierungsgrad bei den nichtmetastasierten Tumoren

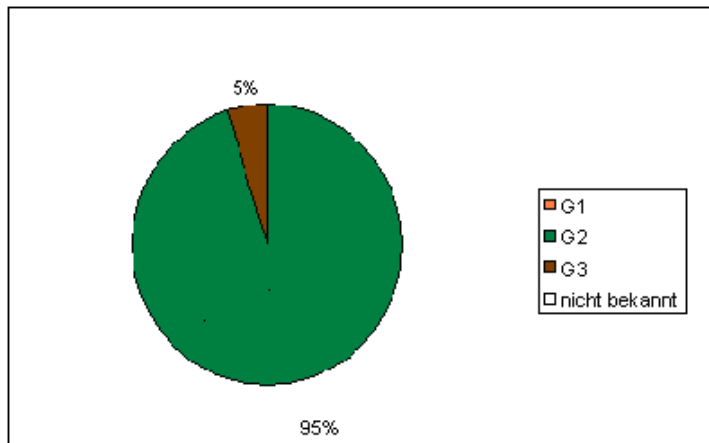


Abbildung 12b: Differenzierungsgrad bei den metastasierten Tumoren

Die Korrelation der Mikrosatellitenanalyse zum Grading zeigt auf Chromosom 9 und 18 eine Zunahme von Aberrationen (LOH, SHIFT, homozygote Deletion) mit zunehmendem Tumorgad.

	Chromosom 9		Chromosom 18	
	nichtmetastasiert	metastasiert	nichtmetastasiert	metastasiert
G1	1/7 (14 %)	0/0	1/7 (14 %)	0/0
G2	6/10 (60 %)	17/20 (85 %)	4/10 (40 %)	11/20 (55 %)
G3	0/0	1/1 (100 %)	0/0	1/1 (100 %)

Tabelle 9: Korrelation der MSA zum Grading (Zahl der Tumoren mit Aberrationen/ Gesamtzahl der Tumoren in der entsprechenden Gruppe)

Werden die Ergebnisse der MSA mit der T-Kategorie korreliert, so zeigen sich Aberrationen durchschnittlich häufiger bei Tumoren mit höherem T-Stadium.

	Chromosom 9		Chromosom 18	
	nichtmetastasiert	metastasiert	nichtmetastasiert	metastasiert
pT1	2/5 (40 %)	0/1	2/5 (40 %)	0/1
pT2	4/10 (40 %)	6/7 (86 %)	3/10 (30 %)	3/7 (43 %)
pT3a	2/3 (67 %)	6/6 (100 %)	1/3 (33 %)	3/6 (50 %)
pT3b	1/1 (100 %)	3/5 (60 %)	1/1 (100 %)	4/5 (80 %)
pT4	0/0	1/1 (100 %)	0/0	1/1 (100 %)

Tabelle 10: Korrelation der MSA zur T-Kategorie (Zahl der Tumoren mit Aberrationen/ Gesamtzahl der Tumoren in der entsprechenden Gruppe)

5.3. Mikosatellitenmarkeranalyse

5.3.1. Genetische Veränderungen auf Chromosom 9

Als Veränderungen werteten wir LOH (Verlust der Heterozygotie), Shift (Verkürzung / Verlängerung eines Allels durch Verlust / Zugewinn von genetischem Material) und Verlust beider Allele (Homozygote Deletion). Bei erhaltener Heterozygotie (o) wurde dies als unverändert interpretiert. Von Anfang an bestehende Homozygotie war nicht informativ (-).

Bei 17 der 21 metastasierten Tumoren waren Veränderungen nachweisbar (81%). In der Gruppe der nichtmetastasierten Tumoren konnte eine Veränderung nur in 9 von 19 Fällen (47,4%) nachgewiesen werden. Dies war statistisch signifikant ($p=0,025$). Werden ausschließlich klarzellige Tumoren berücksichtigt, so zeigten sich bei 12 der 16 metastasierten Tumoren Veränderungen (75 %). Demgegenüber waren nur bei 6 der 15 nichtmetastasierten Tumoren Alterationen nachzuweisen (40 %). Auch dabei wurde statistische Signifikanz erreicht ($p=0,046$).

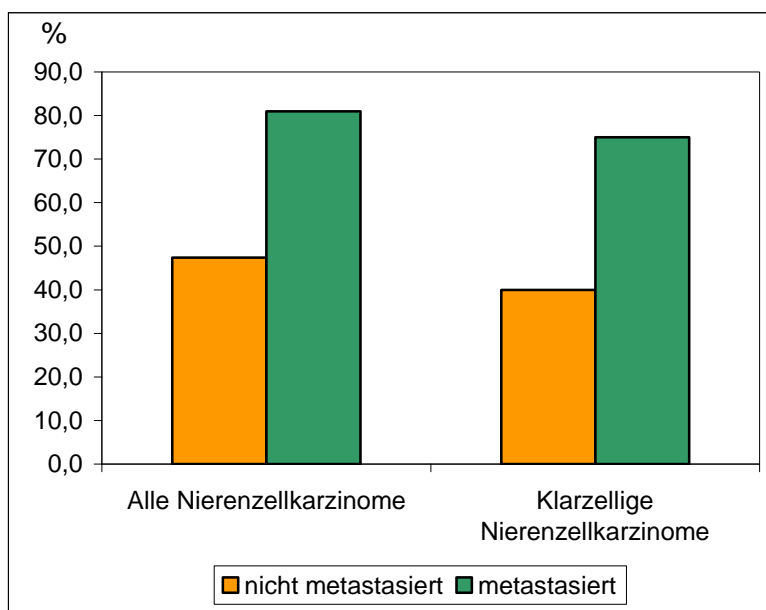


Abbildung 13: Alterationen auf Chromosom 9

Bei Marker L1(D9S937; 9p24.1) beobachteten wir bei den metastasierten Tumoren in 7 von 21 Fällen eine Veränderung (33 %). In der Gruppe der nichtmetastasierten Tumoren konnten wir Alterationen in 3 von 19 Fällen nachweisen (15,8 %; $p=0,195$). Werden nur die klarzelligen Tumoren berücksichtigt, so zeigten sich in 4 von 16 Fällen bei den metastasierten (25 %) und 2 von 15 bei den nichtmetastasierten Tumoren Veränderungen (13,3 %; $p=0,152$). Für den Marker L2(D9S925; 9p23) wurden in 5 Fällen Veränderungen bei den metastasierten Tumoren und in 3 Fällen bei den nichtmetastasierten Tumoren festgestellt (23,8 % vs. 15,8 %; $p=0,527$). Bei den klarzelligen Tumoren konnten wir Alterationen bei 4 der metastasierten und bei 2 der nichtmetastasierten Tumoren nachweisen (25 % vs. 13,3 %; $p=0,407$). Die Auswertung des Markers L3(D9S1678; 9p13) zeigte in 7 Fällen bei den metastasierten und in 6 Fällen bei den nichtmetastasierten Tumoren eine Veränderung (33,3 % vs. 31,6 %; $p=0,906$). Auch unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Nierenzellkarzinome- 5 Fälle mit Veränderung bei den metastasierten, 3 Fälle mit nachgewiesener Veränderung bei den nichtmetastasierten Tumoren (31,3 % vs. 20 %; $p=0,472$)- konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden. Ähnlich verhält es sich auch für Marker L4(D9S320; 9p24.1). In 3 Fällen (metastasiert) und in 2 Fällen (nichtmetastasiert) wurden Alterationen festgestellt (14,3 % vs. 10,5 %; $p=0,719$). Bei den klarzelligen Tumoren konnten wir bei metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren in jeweils einem Fall eine Veränderung aufzeigen (6,3 % vs. 6,7 %; $p=0,962$). Statistische Signifikanz wurde für Marker L5(D9S1118; 9p13) berechnet. Hier waren Veränderungen in der Gruppe der metastasierten Tumore bei 9 Fällen nachweisbar. Demgegenüber zeigten sich bei den nichtmetastasierten Tumoren lediglich 2 Fälle mit Alterationen (42,9 % vs. 10,5 %; $p=0,018$). Auch unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Tumoren war ein signifikanter Unterschied sichtbar: 6 Fälle metastasiert-1 Fall mit Veränderung bei den nichtmetastasierten Tumoren; (37,5 % vs. 6,7 %; $p=0,032$). Bei Marker L6(D9S921; 9p23) konnten wir Alterationen in 10 von 21 Fällen bei den metastasierten und in 5 von 19 Fällen bei den nichtmetastasierten Tumoren aufzeigen (47,6 % vs. 26,3 %; $p=0,162$). Ähnlich verhält es sich, wenn ausschließlich klarzellige Tumoren berücksichtigt werden: 6 Fälle bei den metastasierten und 4 Fällen bei den nichtmetastasierten Karzinomen zeigten Veränderungen (37,5 % vs. 26,7 %; $p=0,518$). Im Folgenden wird dies graphisch dargestellt.

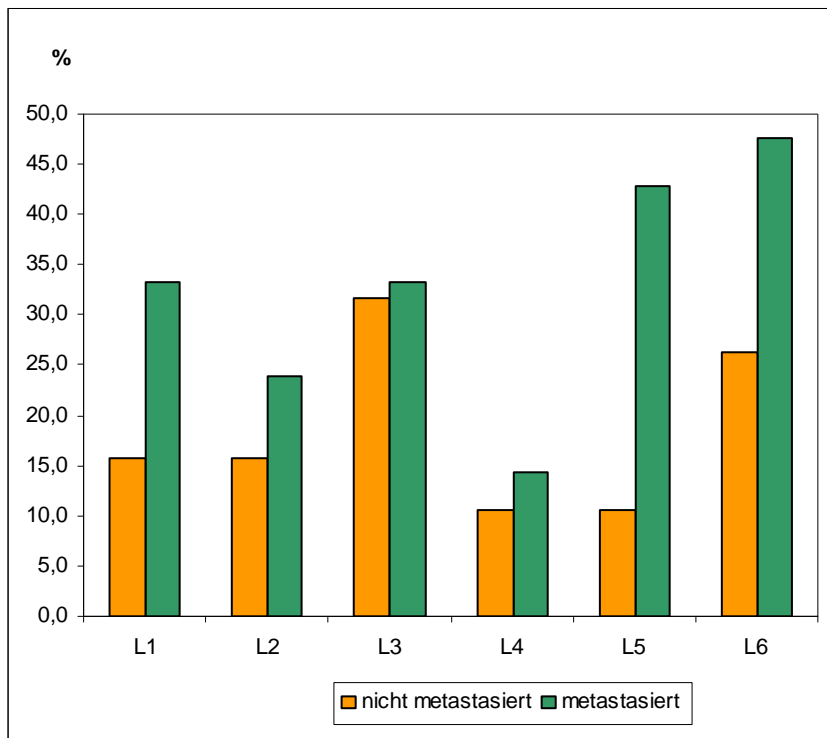


Diagramm 14a: Veränderungen auf Chromosom 9 (alle Tumoren)

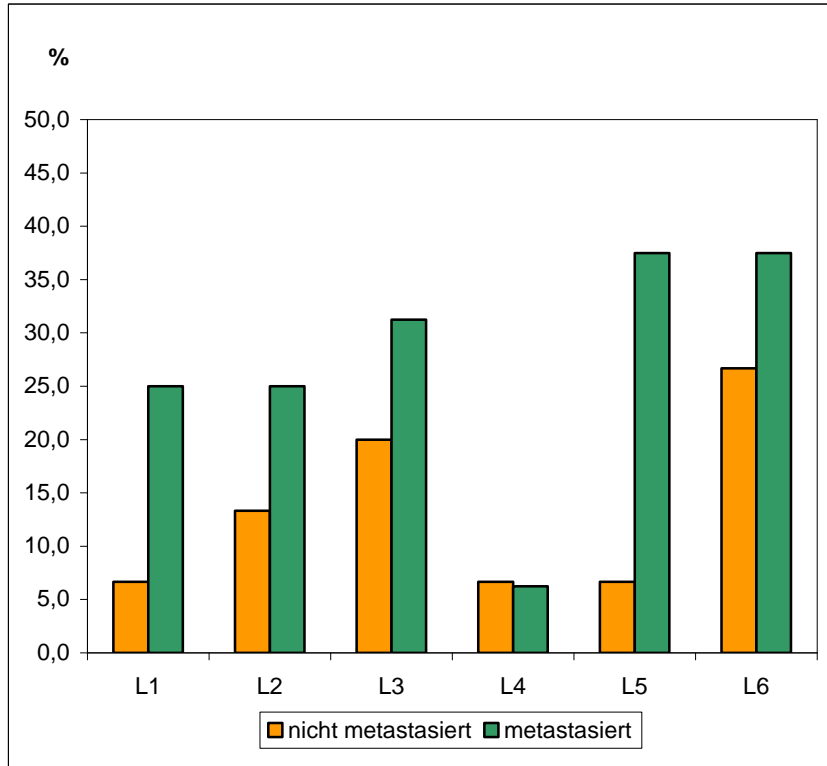


Diagramm 14b: Veränderungen auf Chromosom 9 (klarzellige Tumoren)

Nachfolgend werden einige Beispiele aufgeführt.

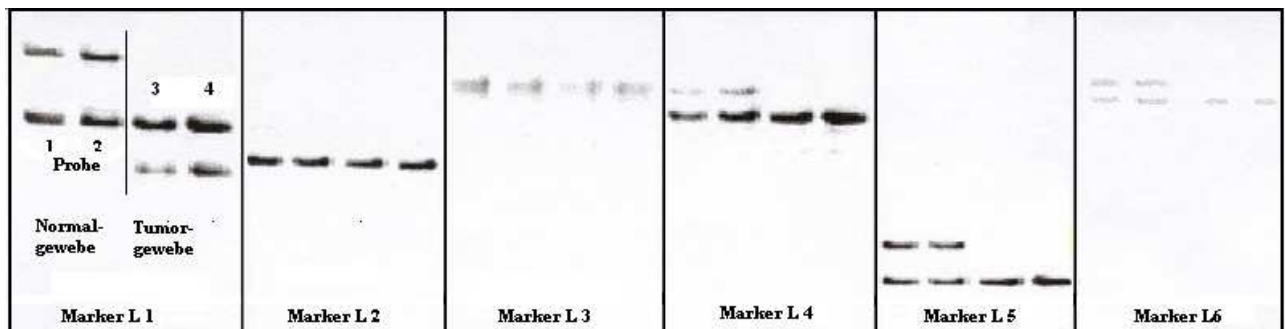


Abbildung 15a: Gelelektrophorese des Falls N6 (metastasierter Tumor). Untersuchung des Chromosoms 9 mit 6 verschiedenen Markern. Es erfolgt jeweils eine Doppelbestimmung, wobei es sich bei den ersten beiden Proben um Normalgewebe, bei den Proben 3 und 4 um Tumorgewebe handelt. Es zeigt sich bei Marker L1 eine Mikrosatelliteninstabilität im Tumorgewebe (SHIFT). Die Untersuchung mit Marker L4, L5 und L6 weist Allelverluste im Tumorgewebe nach (LOH). Wegen bestehender Homozygotie sind die Ergebnisse bei Marker L3 und L4 nicht informativ.

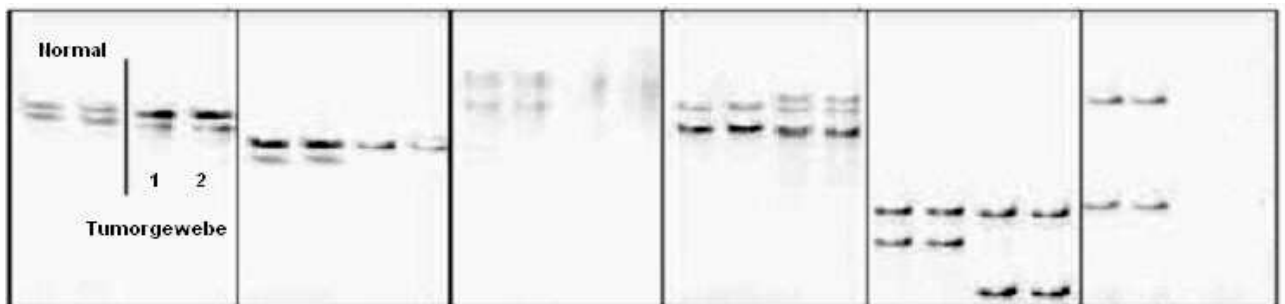


Abbildung 15b: Gelelektrophorese des Falls N24 (nichtmetastasierter Tumor). Wie in Abbildung 15a erfolgte die Untersuchung des Chromosoms 9 mit den Markern L1-L6. Es zeigen sich LOH bei L1 und L2 sowie SHIFT bei L4 und L5. Der Marker L3 ist nicht informativ. Bei L6 liegt eine homozygote Deletion (Verlust des mütterlichen und väterlichen Allels) im Tumorgewebe vor.

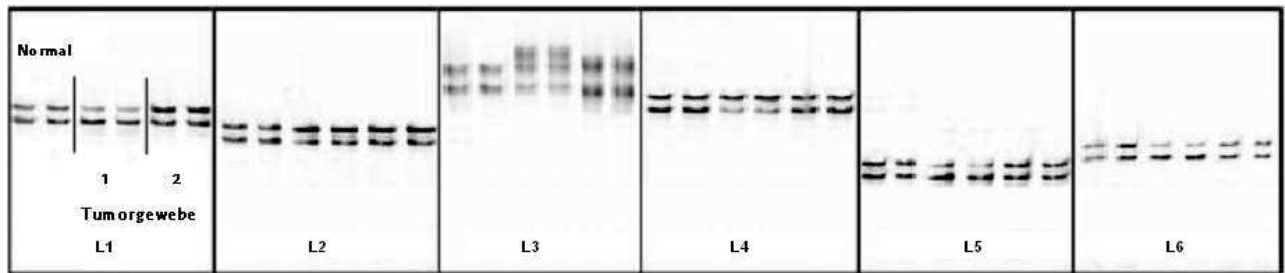


Abbildung 15c: Gelelektrophorese des Falls N121 (nichtmetastasierter Tumor). Wie bei Abbildung 15a und 15b erfolgte die Untersuchung des Chromosoms 9 mit 6 verschiedenen Markern (L1-L6). Hier werden jedoch- neben dem Normalgewebe- Tumorgewebe von 2 verschiedenen Stellen einer Neubildung (jeweils als Doppelbestimmung) untersucht. Tumorgewebe 1 zeigt bei L1, L2, L4, L5 und L6 ein LOH sowie bei L3 ein SHIFT. Tumorgewebe 2 weist keine Veränderungen auf.

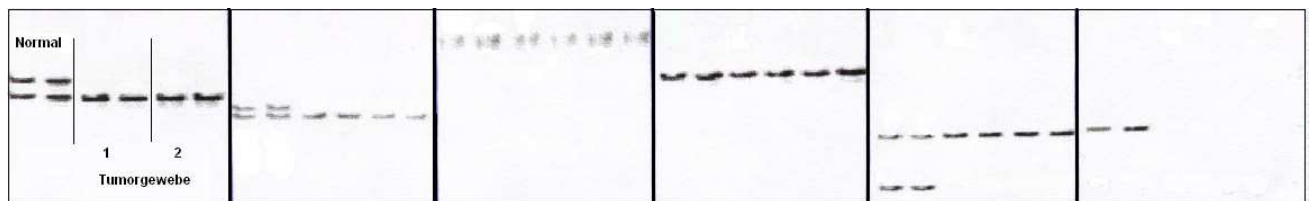


Abbildung 15d: Gelelektrophorese des Falls N29 (metastasierter Tumor). Untersuchung des Chromosoms 9 mit Marker L1-L6 (s. Abbildung 15c). Beide Tumorproben zeigen ein LOH bei L1, L2 und L5. Marker L3 und L4 sind nicht informativ.

5.3.2. Genetische Veränderungen auf Chromosom 18

Auf Chromosom 18 waren bei 12 der 21 metastasierten Tumoren Veränderungen nachweisbar (57,1 %). Bei den nichtmetastasierten Tumoren zeigten sich Veränderung nur in 7 von 19 Fällen (36,8 %). Dies war statistisch nicht signifikant ($p=0,197$).

Berücksichtigt man nur klarzellige Tumoren, so zeigten sich bei 10 der 16 metastasierten Fälle Veränderungen (62,5 %). Alterationen bei den nichtmetastasierten Tumoren waren bei 6 von 15 Fällen nachzuweisen (40 %). Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht ($p=0,208$).

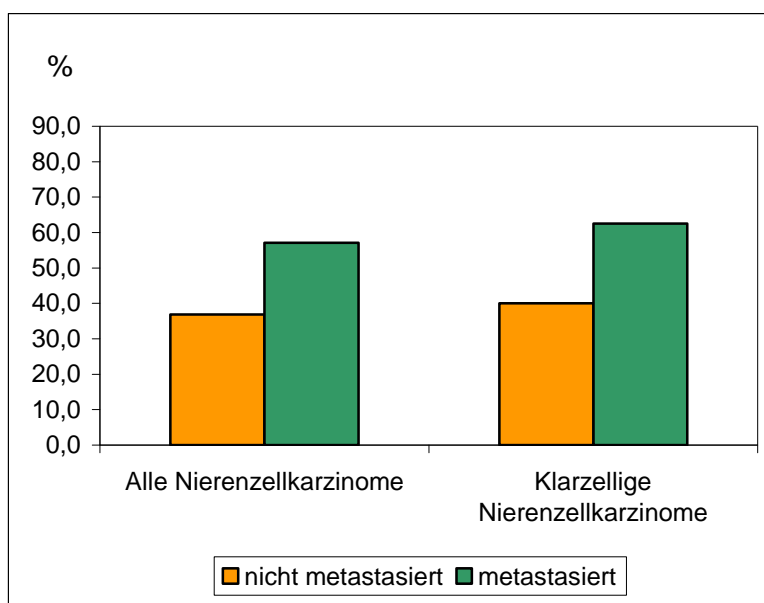


Abbildung 16: Alterationen auf Chromosom 18

Für den Marker M1(D18S462;18q23) konnte in der Gruppe der metastasierten Tumoren in 1 von 21 Fällen eine Veränderung nachgewiesen werden (4,8 %). Bei den nichtmetastasierten Tumoren fanden sich Alterationen in 3 von 19 Tumoren (15,8 %; $p=0,574$). Werden nur klarzellige Tumoren berücksichtigt, so war bei den metastasierten Tumoren keine Veränderung nachweisbar, bei den nichtmetastasierten Tumoren zeigten sich in 3 von 15 Fällen Veränderungen (0 % vs. 20 %; $p=0,030$). Die Auswertung des Markers M2(D18S55;18q22.1) erbrachte bei den metastasierten Tumoren in 3 Fällen Veränderungen, bei den nichtmetastasierten Tumoren konnten Alterationen in 4 Fällen beobachtet werden (14,3 % vs. 21,1 %; $p=0,574$). Bei den klarzelligen Tumoren zeigten sich für metastasierte und nichtmetastasierte Tumoren in jeweils 3 Fällen Veränderungen (18,8 % vs. 20 %; $p=0,930$). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für Marker

M3(D18S61; 18q22.3): 2 Tumoren mit Veränderungen (metastasiert), 3 Tumoren mit Veränderung (nichtmetastasiert)-9,5 % vs. 15,8 %; $p=0,549$. In der Gruppe der klarzelligen Tumoren fanden sich bei jeweils 2 Fällen Alterationen (metastasiert 12,5 % vs. nichtmetastasiert 13,3 %; $p=0,945$). Bei Marker M4(D18S66; 18q12.1) konnten wir Alterationen in 2 von 21 Fällen bei den metastasierten und 3 von 19 Fällen bei den nichtmetastasierten Tumoren aufzeigen (9,5 % vs. 15,8 %; $p=0,549$). Werden auch hier nur die klarzelligen Tumoren berücksichtigt, so fanden sich bei einem Tumor (metastasiert) und 2 Tumoren (nichtmetastasiert) Veränderungen (6,3 % vs. 13,3 %; $p=0,502$). Für Marker M6(D18S390; 18q22.3) konnten bei 4 metastasierten (19,0 %) und einem nichtmetastasierten Tumor (5,3 %) Veränderungen nachgewiesen werden ($p=0,173$). Bei den klarzelligen Tumoren zeigten sich nur in der Gruppe der metastasierten Tumoren bei 2 Fällen Veränderungen (12,5 %; $p=0,096$). Statistische Signifikanz konnte für Marker M7(D18S541; 18q21) erreicht werden: 10 Tumoren mit Alterationen (metastasiert), 3 Tumoren mit Veränderung (nichtmetastasiert)- (47,6 % vs. 15,8 %; $p=0,028$). Auch unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Tumoren konnte eine signifikante Häufung von Alterationen bei den metastasierten (56,3 %) gegenüber den nichtmetastasierten Tumoren (20,0 %) gezeigt werden ($p=0,035$).

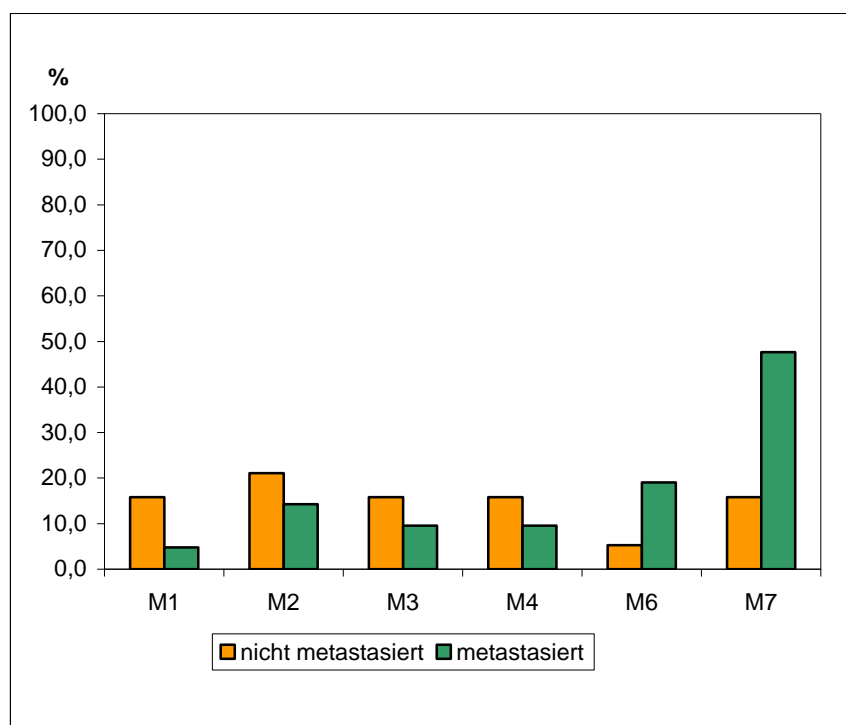


Abbildung 17a: Veränderungen auf Chromosom 18 (alle Tumoren)

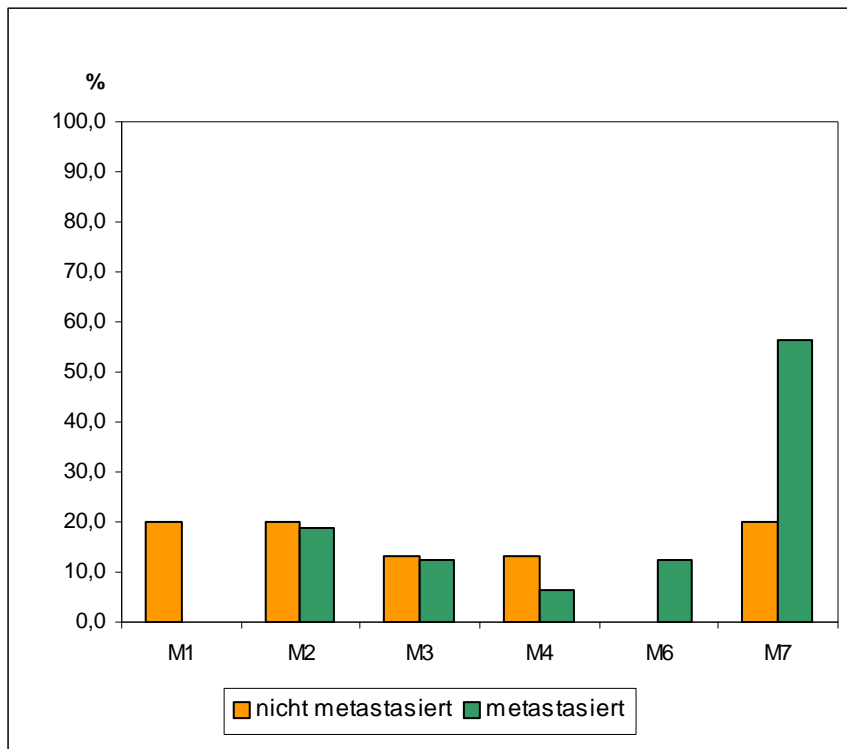


Diagramm 17b: Veränderungen auf Chromosom 18 (klarzellige Tumoren)

Nachfolgend werden zwei Beispiele aufgeführt.

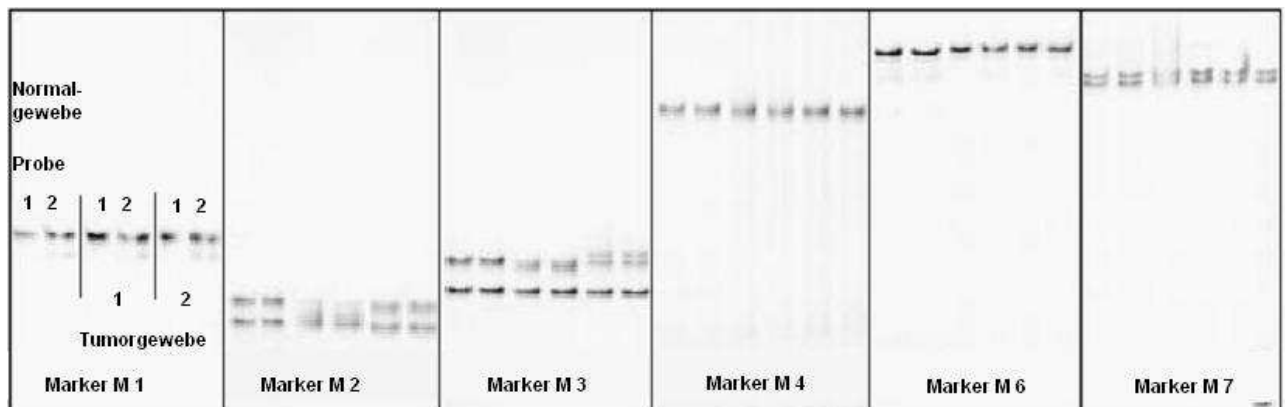


Abbildung 18a: Gelelektrophorese des Falls N121 (nichtmetastasierter Tumor). Es zeigt sich bei Marker M2 ein LOH in Tumorgewebe 1 sowie ein SHIFT bei Marker M3 für Tumorgewebe 2. Unveränderte Homozygotie bei Marker M4 und M6, erhaltene Heterozygotie bei Marker M7.

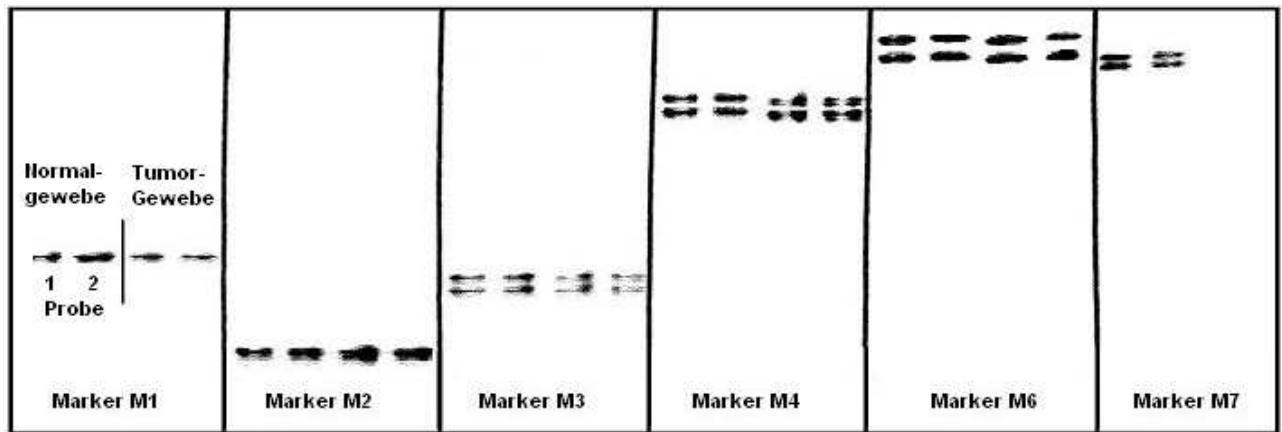


Abbildung 18b: Gelelektrophorese des Falls N151 (metastasierter Tumor). Unveränderte Homozygotie bei Marker M1 und M2, erhaltene Heterozygotie bei Marker M3, M4 und M6. Homozygote Deletion bei Marker M7.

5.4. Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Das genetische Material der 21 metastasierten und 19 nichtmetastasierten Primärtumoren wurde auch mittels CGH untersucht. Hierbei sollten die durch Mikrosatellitenanalyse gewonnenen Daten überprüft sowie weitere mit der Metastasierung in Verbindung stehende kritische Regionen gefunden werden.

Werden metastasierte und nichtmetastasierte Tumoren verglichen, so zeigen sich Chromosomenverluste des Chromosoms 1 ausschließlich bei metastasierten Tumoren (4,8 %). Zugewinne werden hier nicht beobachtet. Bei 15,8 % der nichtmetastasierten und 4,8 % der metastasierten Tumoren fanden sich Zugewinne auf Chromosom 2q. Wie auch in der Literatur angegeben, waren Deletionen des Chromosoms 3p eine sehr häufige Veränderung. Metastasierte Tumoren zeigten in 76 %, nichtmetastasierte Tumoren in 57,9 % der Fälle Deletionen. Verluste des q-Arms waren wie Zugewinne des p-Arms von Chromosom 3 sehr selten. Wir beobachteten dies in jeweils 4,8 % der metastasierten und 10,5 % der nichtmetastasierten Tumoren. Zugewinne des Chromosoms 3q waren ausschließlich bei nichtmetastasierenden Tumoren nachzuweisen (15,8 %; $p=0,03$).

Verluste des Chromosoms 4 betrafen ausschließlich den q-Arm und wurden nur bei metastasierenden Tumoren in 4,8 % der Fälle gefunden. Zugewinne des Chromosoms 4 stellten mit 4,8 % bei metastasierenden Tumoren ein seltenes Ereignis dar. Häufiger war diese Veränderung bei nichtmetastasierenden Tumoren (p-Arm=10,5 %; q-Arm=15,8 %). Deletionen des Chromosoms 5q dokumentierten wir in 14,3 % bei metastasierenden und in 5,3 % bei nichtmetastasierenden Tumoren. Mit 28,6 % waren bei metastasierenden Tumoren Zugewinne von 5p geringfügig häufiger als bei nichtmetastasierenden Tumoren (21,1 %). Zugewinne von Chromosom 5q stellten mit 42,9 % bei metastasierten und 47,4 % bei nichtmetastasierten Tumoren eine häufige Veränderung dar. Deletionen des Chromosoms 6p traten in 19 % bei metastasierten und 15,8 % der nichtmetastasierten Tumoren auf. Verluste des q-Arms waren nur bei nichtmetastasierenden Tumoren zu finden (5,3 %), Zugewinne des q-Arms nur bei metastasierenden Tumoren (9,5 %). Auf Chromosom 7 konnten sowohl bei metastasierenden als auch bei nichtmetastasierenden Tumoren fast ausschließlich Zugewinne verzeichnet werden (7p: metastasiert=19,0 %; nichtmetastasiert=21,1 %; 7q: metastasiert=28,6 %, nichtmetastasiert= 26,3 %). Verluste des q-Arms von Chromosom 7 wurden nur bei metastasierenden Tumoren beobachtet (4,8 %). Auf Chromosom 8p konnten deutlich häufiger Deletionen bei metastasierten Tumoren gesehen werden (metastasiert=23,8 %; nichtmetastasiert=5,3 %). Verluste des

q-Arms von Chromosom 8 waren mit 4,8 % bei den metastasierten und 5,3 % bei nichtmetastasierten Tumoren sehr selten. Zugewinne des Chromosoms 8 beobachteten wir ausschließlich bei 8q (metastasiert=28,6 %; nichtmetastasiert=10,5 %). Einen statistisch signifikanten Unterschied konnten wir für Deletionen des Chromosoms 9q nachweisen. Hier wurden Verluste bei metastasierenden Tumoren in 38,1 %, bei nichtmetastasierenden Tumoren in 5,3 % gefunden ($p=0,009$). Verluste des p-Arms waren deutlich seltener (metastasiert=14,3 %, nichtmetastasiert=5,3 %). Zugewinne des Chromosoms 9 detektierten wir nicht. Metastasierende Tumoren zeigten in 4,8 % Zugewinne des Chromosoms 10 (sowohl p- als auch q-Arm). Verluste waren ebenfalls nur bei metastasierenden Tumoren auffällig (9,5 %). Die Chromosomen 11 und 12 zeigten ausschließlich Zugewinne auf 11q (metastasiert=4,8%, nichtmetastasiert= 5,3 %), 11p (metastasiert=9,5 %, nichtmetastasiert=5,3 %). Zugewinne von 12q verzeichneten wir in jeweils 14,3 % bei metastasierenden, sowie in 10,5 % bei nichtmetastasierenden Tumoren. Metastasierende Tumoren zeigten Verluste des Chromosoms 13 in 4,8 % der Fälle. Zugewinne 13q wurden in 14,3 % bei metastasierenden und in 10,5 % bei nichtmetastasierenden Tumoren nachgewiesen. Deletionen des Chromosoms 14 stellten mit 42,9 % ein häufiges Ereignis bei metastasierenden Tumoren dar (nichtmetastasiert=5,3 %; $p=0,004$). Verluste 14p fanden wir in 9,5 % bei metastasierenden Tumoren. Nichtmetastasierende Tumoren zeigen Verluste des Chromosoms 15 in 5,3 % (15q: metastasiert=4,8 %). Deletionen des Chromosoms 16 waren in der Gruppe der metastasierenden Tumoren mit 9,5 % vergleichbar häufig wie bei nichtmetastasierenden Tumoren (10,5 %). Nur metastasierende Tumoren zeigten Verluste 16q (4,8 %). Chromosomenverlust 17p war mit 33,3 % bei metastasierenden Tumoren häufiger (nichtmetastasierend 21,1 %). Eine Deletion des q-Arms war hingegen in der Gruppe der nichtmetastasierenden Tumoren mit 21,1 % häufiger als bei metastasierenden Tumoren (14,3 %). Einen signifikanten Unterschied zwischen metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumoren fanden wir für Chromosomenverlust 18p. Dies war mit 28,6 % deutlich häufiger bei metastasierenden Tumoren (nichtmetastasierend 5,3 %; $p=0,042$). Deletion 18q zeigte sich ausschließlich bei metastasierenden Tumoren (9,8 %). Zugewinne dieses Chromosomenabschnittes konnten in 4,8 % bei metastasierenden und in 15,8 % bei nichtmetastasierenden Tumoren nachgewiesen werden. Zugewinne der Chromosomen 15, 16,17 und 18p wurden nicht gefunden. Die Chromosomen 19, 20, 21 und 22 zeigten keine Aberrationen.

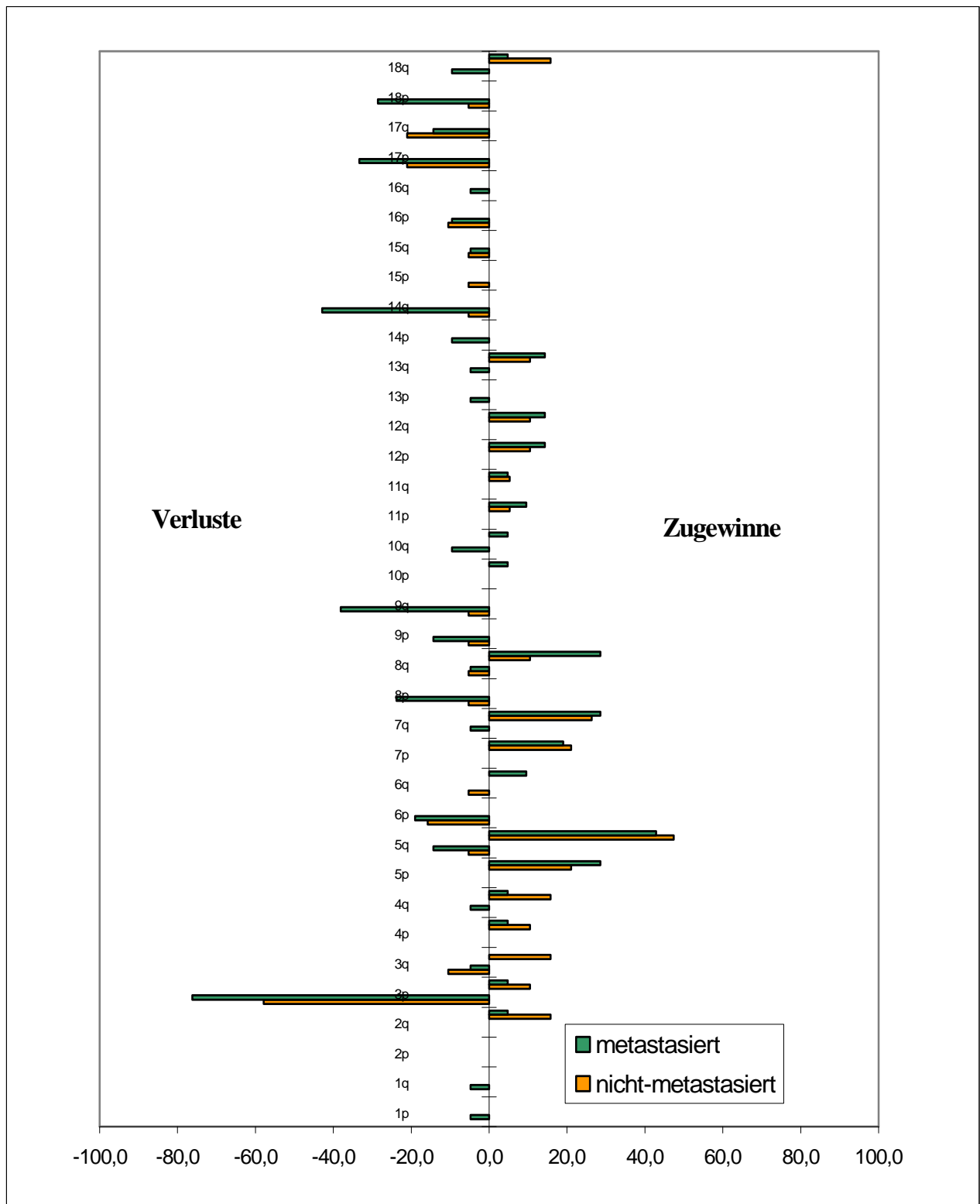


Abbildung 19a: Ergebnisse der CGH-Untersuchung (alle Tumoren)

Deletionen des Chromosoms 1 fanden sich in der Gruppe der metastasierten klarzelligen Tumore in 6,3 %. Zugewinne werden hier nicht beobachtet. Auf Chromosom 2q ließen sich in 20 % der Fälle Zugewinne auf dem q-Arm nachweisen (metastasiert 6,3 %). In 87,5 % der Fälle zeigten sich Deletionen 3p bei metastasierten Tumoren, bei nichtmetastasierten Tumoren nur in 66,7 %. Verluste 3q wiesen wir mit 13,3 % ausschließlich bei nichtmetastasierten Tumoren nach. Zugewinne auf Chromosom 3 wurden nur in wenigen Fällen beobachtet (3q: 6,7 % metastasierte Tumoren; 3p 6,3 % nichtmetastasierte Tumoren). Verluste des Chromosoms 4 waren nur in 6,3 % auf dem q-Arm bei metastasierten Tumoren nachweisbar. Zugewinne des Chromosoms 4 wiesen wir nur bei nichtmetastasierten Tumoren nach (4p: 13,3 %; 4q: 20 %). Für 4q war der Unterschied signifikant ($p=0,03$). Deletionen des Chromosoms 5 betrafen ausschließlich den q-Arm und waren mit 12,5 % geringfügig häufiger bei metastasierten Tumoren (nichtmetastasiert= 6,7 %). Auch auf Chromosom 5 waren Zugewinne häufiger bei nichtmetastasierten Tumoren nachzuweisen. In 26,7 % zeigten sich Zugewinne 5p (metastasiert= 12,5 %), in 53,3 % Zugewinne auf 5q (metastasiert= 37,5 %). Verluste des Chromosoms 6q wurden in 18,8 % der Fälle bei metastasierten, in 13,3 % bei nichtmetastasierten Tumoren gefunden. Deletionen von 6q zeigten sich mit 6,7 % nur bei nichtmetastasierten Tumoren. Zugewinne dieses Chromosomenabschnitts detektierten wir mit 6,3 % nur bei metastasierten Tumoren. Chromosom 7 zeigte überwiegend Zugewinne mit leichter Häufung bei metastasierten Tumoren (7p: metastasiert=25,0 %; nichtmetastasiert=20 %; 7q: metastasiert=31,3 %, nichtmetastasiert= 26,7 %). Mit 6,7 % fanden wir bei nichtmetastasierten Tumoren Deletionen 8p und 8q. Metastasierte Tumoren zeigten Verluste 8p in 18,8 %. Zugewinne auf 8q fanden sich in 25 % bei metastasierten und in 13,3 % bei nichtmetastasierten Tumoren. Signifikant mehr Verluste bei metastasierten Tumoren konnten wir mit 37,5 % bei Chromosom 9q nachweisen (nichtmetastasiert 6,7 %; $p=0,032$). Auch bei 9p überwogen Verluste bei metastasierten Tumoren, allerdings war dies weniger deutlich (metastasiert=18,8 %, nichtmetastasiert=6,7 %). Chromosom 10 zeigte lediglich Deletionen auf dem q-Arm bei metastasierten Tumoren in 12,5 %. Auf 11p fanden wir bei metastasierten Tumoren Zugewinne in 6,3 %. Deletionen wurden auf Chromosom 11 und 12 nicht beobachtet. Auf 12p und 12q detektierten wir in jeweils 18,8 % Zugewinne bei metastasierenden Tumoren sowie in 6,7 % bei nichtmetastasierenden Tumoren. Die Chromosomenarme 13p und 13q zeigten in jeweils 6,3 % Verluste bei metastasierenden Tumoren. Mit 12,5 % waren Zugewinne 13q etwas häufiger bei metastasierenden Tumoren als bei nichtmetastasierenden Tumoren (6,7 %). Signifikant mehr Deletionen wiesen wir mit

43,8 % auf 14q bei metastasierenden Tumoren nach. Nichtmetastasierte Tumoren zeigten diese Veränderung nur in 6,7 % ($p=0,013$). Chromosomenverluste des p-Arms von Chromosom 14 wurden in 12,5 % bei metastasierenden Tumoren dokumentiert. Nichtmetastasierte Tumoren zeigten Deletionen des Chromosoms 15 in 6,7 %. Metastasierte Tumoren zeigten Chromosomenverluste 15q in 6,3 %. Deletionen des Chromosoms 16 konnten nur bei metastasierenden Tumoren in 6,3 % gefunden werden. Verluste des Chromosoms 16 p betrafen metastasierte und nichtmetastasierte Tumoren ähnlich häufig (metastasiert=12,5 %, nichtmetastasiert=13,3 %). Bei Chromosom 17 überwogen Verluste des q-Arms mit 26,7 % bei nichtmetastasierenden Tumoren (metastasiert=12,5 %); auf dem p-Arm waren Deletionen mit 37,5 % bei metastasierenden Tumoren häufiger (nichtmetastasiert=26,7 %). Deletionen 18p identifizierten wir bei metastasierenden Tumoren in 25 %. Bei nichtmetastasierenden Tumoren war dies nur in 6,7 % der Fälle nachzuweisen. Chromosom 18q zeigte nur bei metastasierenden Tumoren Verluste (6,3 %) sowie bei nichtmetastasierenden Tumoren Zugewinne (13,3 %). Bei den Chromosomen 14, 15, 16 und 17 konnten keine Zugewinne detektiert werden. Nachfolgend wird dies graphisch dargestellt.

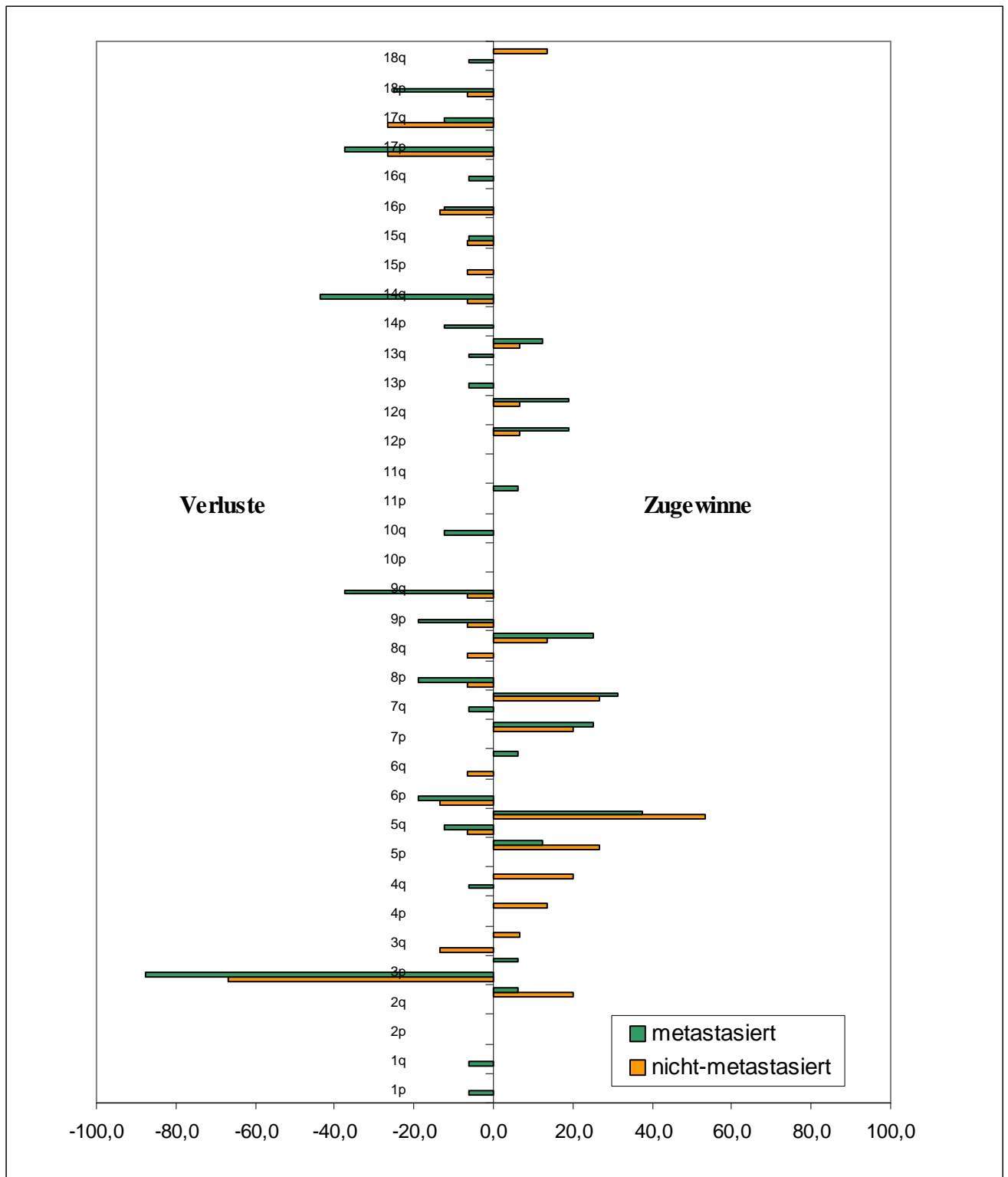


Abbildung 19a: Ergebnisse der CGH-Untersuchung (klarzellige Tumoren)

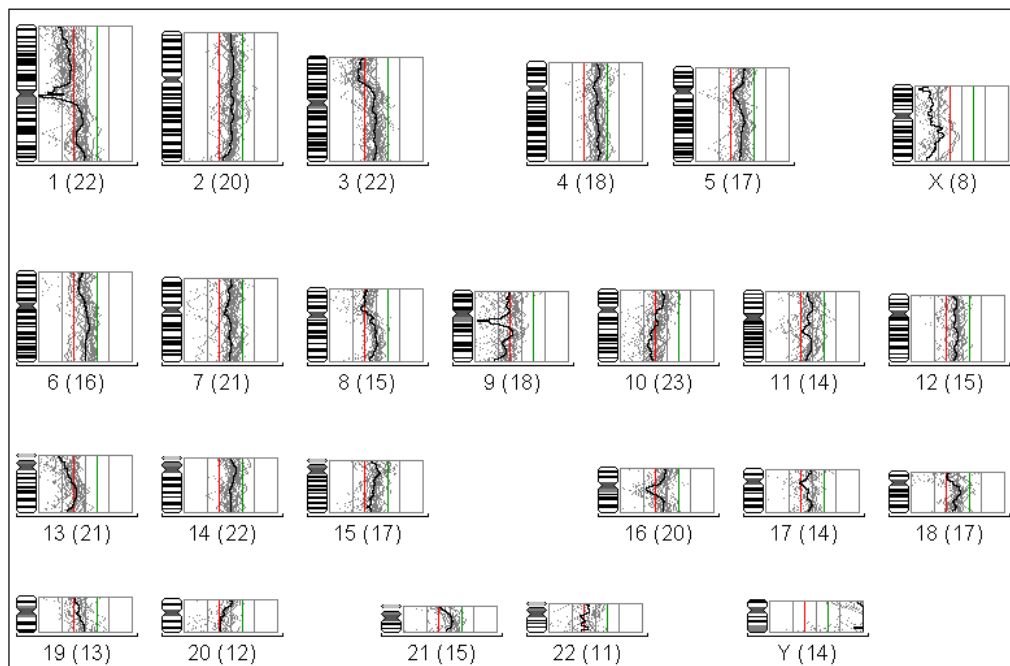


Abbildung 20a: Darstellung des mittleren Fluoreszenzprofils aller ausgewerteten Metaphaseplatten des Falls N63 (metastasierter Tumor). Nach der Nummer des ausgewerteten Chromosoms wird die Anzahl der ausgewerteten Fälle in Klammern angegeben. Verluste und Zugewinne zeigen sich in einem Abweichen des Summenprofils von der Mittellinie in Richtung Grün bzw. Rot. Es zeigen sich $\text{dim}(1p)$, $\text{dim}(3p14)$, $\text{dim}(6p)$, $\text{dim}(8p)$, $\text{dim}(9)$, $\text{dim}(10q)$, $\text{dim}(13)$.

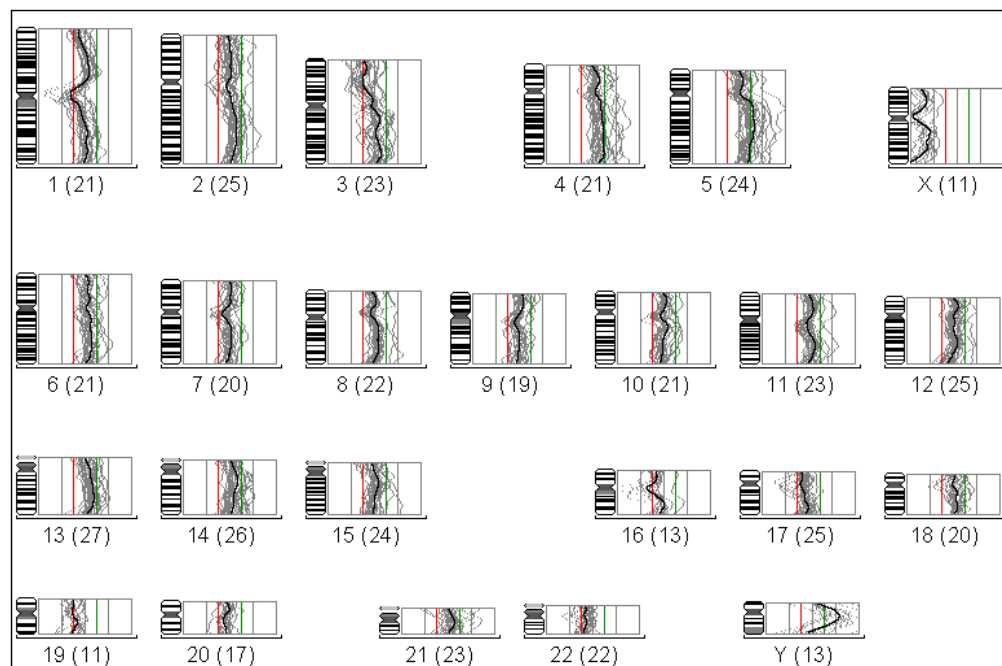


Abbildung 20b: Darstellung des mittleren Fluoreszenzprofils aller ausgewerteten Metaphaseplatten des Falls N123 (nichtmetastasierter Tumor). Es zeigte sich ein Verlust auf 3p ($\text{dim}(3p13\text{pter})$) und ein Zugewinn auf 5q ($\text{enh}(5q)$).

5.5. Vergleichen der Ergebnisse zwischen CGH und MSA

Bei der Mikrosatellitenmarker-Analyse konnten in der Gruppe aller Tumoren bei 17 der 21 metastasierten Fälle Veränderungen auf Chromosom 9p nachgewiesen werden (81 %). Die CGH-Untersuchung zeigte für das Chromosom 9 bei 9 Fällen Deletionen (42,9 %). Zugewinne auf Chromosom 9 waren nicht feststellbar. Untersucht man die Chromosomenarme getrennt, so fanden wir auf 9p nur bei 3 Fällen einen Verlust von genetischem Material (14,3 %). Betrachtet man 9q, so sind bei 8 Fällen Deletionen (38,1 %) zu erkennen.

In der Gruppe der nichtmetastasierten Tumoren (gesamt) waren auf Chromosom 9p MSA-Veränderungen in 9 von 19 Fällen (47,4 %) nachgewiesen worden. Die CGH-Untersuchung zeigte für das Chromosom 9 nur bei einem Fall Chromosomenverluste (5,3 %). Hierbei waren p- und q-Arm betroffen.

Wurden ausschließlich klarzellige Tumoren berücksichtigt, so konnte die PCR bei 12 der 16 metastasierten Tumoren Alterationen aufzeigen (75 %). Die CGH wies für das Chromosom 9 bei 7 Fällen Deletionen nach (43,8 %). Davon konnten 3 Verluste auf Chromosom 9p (18,8 %) und 6 Deletionen auf 9q (37,5 %) festgestellt werden.

Bei den nichtmetastasierten klarzelligen Tumoren fanden wir durch PCR bei 6 Fällen Alterationen (40 %), durch CGH-Untersuchung nur in einem Fall (6,7 %). Dabei waren p- und q-Arm betroffen.

Für das Chromosom 18 waren mittels PCR bei 12 der metastasierten Tumoren (gesamt) Veränderungen nachzuweisen (57 %). Die CGH zeigte einen Verlust auf Chromosom 18 bei 7 Fällen (38,9 %). Wurden die Chromosomenarme getrennt betrachtet, so beobachteten wir auf 18p bei 6 Tumoren Deletionen (28,6 %), auf 18q waren es 2 Tumoren (9,5 %). Zugewinne waren bei einem Fall (18 q) nachgewiesen worden (4,8 %). Bei den nichtmetastasierten Tumoren (gesamt) konnten Veränderungen durch PCR in 7 von 19 Fällen gezeigt werden (36,8 %). Die CGH fand auf Chromosom 18 bei einem Fall eine Deletion (5,3 %). Diese war dem p-Arm zuzuordnen. Zugewinne waren in 3 Fällen (15,8 %) auf 18q zu sehen.

Unter ausschließlicher Berücksichtigung klarzelliger Tumoren hatten wir durch PCR bei 10 von 16 metastasierten Tumoren Veränderungen aufgezeigt (62,5 %); durch CGH-Analyse fanden sich hier bei 5 Fällen Verluste (31,3 %). Zugewinne konnten bei keinem Fall beobachtet werden. Unter besonderer Berücksichtigung der Chromosomenarme waren bei 4 Fällen auf 18 p Deletionen nachzuweisen (25 %), auf 18 q bei einem Fall (6,3 %).

In der Gruppe der nichtmetastasierten klarzelligen Tumoren konnten durch PCR bei 6 Fällen Veränderungen nachgewiesen werden (40%). Durch CGH-Untersuchung war bei einem Fall ein Chromosomenverlust festzustellen (6,7 %). Dieser konnte dem p-Arm zugeordnet werden. Zugewinne lagen bei 2 Tumoren vor (13,3 %) und betrafen den q-Arm. Nachfolgend wird dies graphisch dargestellt.

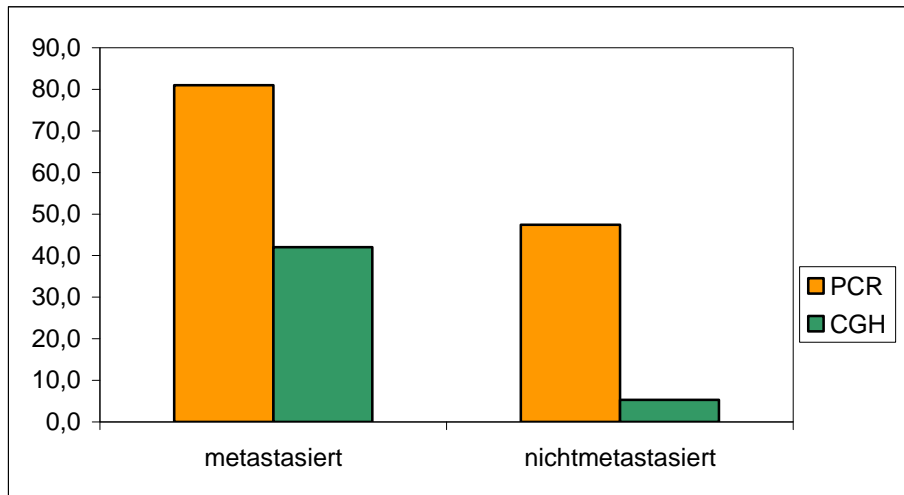


Abbildung 20a: Vergleich der Ergebnisse zwischen CGH und PCR (Alterationen auf Chromosom 9 / alle Tumoren)

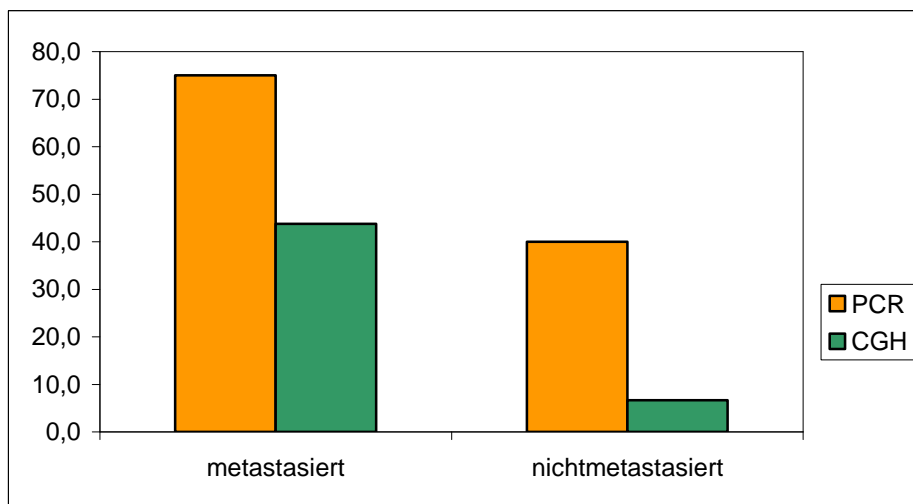


Abbildung 20b: Vergleich der Ergebnisse zwischen CGH und PCR (Alterationen auf Chromosom 9 / klarzellige Tumoren)

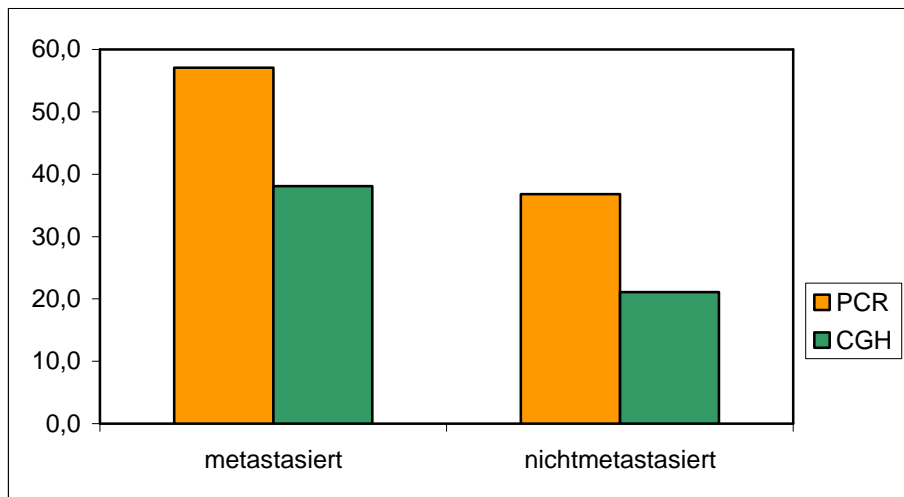


Abbildung 20c: Vergleich der Ergebnisse zwischen CGH und PCR (Alterationen auf Chromosom 18 / alle Tumoren)

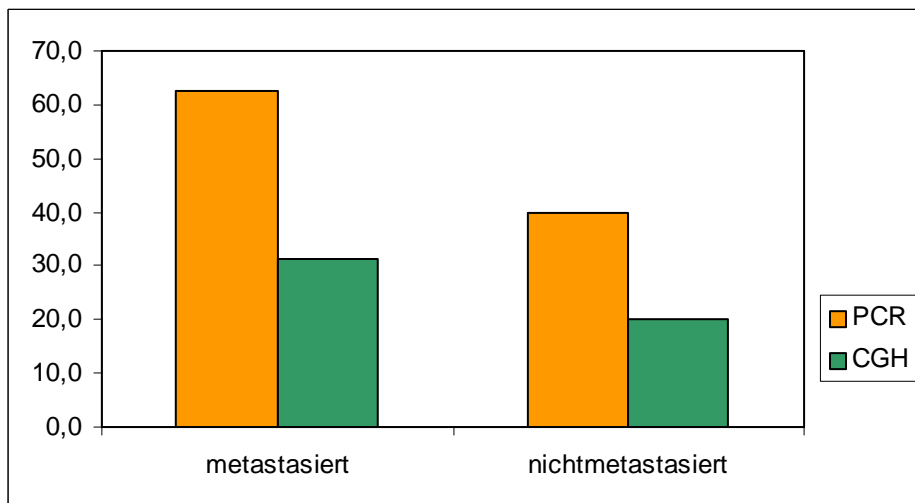


Abbildung 20d: Vergleich der Ergebnisse zwischen CGH und PCR (Alterationen auf Chromosom 18 / klarzellige Tumoren)

6. Diskussion

Das Nierenzellkarzinom ist die dritthäufigste maligne urologische Erkrankung. Genetische Veränderungen, die zur Metastasierung führen, sind noch weitgehend ungeklärt. Ihre Kenntnis könnte zu einer deutlichen Verbesserung des Patientenmanagements führen. Durch Abschätzung des Metastasierungsrisikos zum Zeitpunkt der Diagnose wäre die Bestimmung der Prognose mit individueller Nachsorge und frühzeitiger Therapie möglich. Basierend auf den publizierten chromosomalen Veränderungen metastasierter Tumoren wurden die Chromosomen 9 und 18 detailliert mittels MSA untersucht. Parallel erfolgte die chromosomale Analyse mittels CGH.

6.1. Korrelation der nachgewiesenen Mikrosatellitenmarkerveränderungen zur Metastasierung unter besonderer Berücksichtigung der klarzelligen Nierenzellkarzinome

6.1.1. Analyse genetischer Veränderungen spezifischer Regionen auf dem Chromosom 9
Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Alterationen auf dem Chromosom 9 in der Region 9p13-9p24 signifikant häufiger in metastasierten (81 %) als in nichtmetastasierten (47,4 %) Tumoren nachweisbar sind. Auch unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Tumoren wurde dies bestätigt (75 % vs. 40 %).

Mit den Markern L3 (D9S1678) und L5 (D9S1118) untersuchten wir die Region 9p13. Wir fanden hierbei unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Tumoren Alterationen in 25,8 % (L3) und 22,6 % (L5). Ähnliche Ergebnisse werden von Schraml et al. angegeben. Bei einer Untersuchung von 88 Nierenzellkarzinomen konnten mit 20 % die häufigsten Veränderungen bei Marker D9S171 (9p13) nachgewiesen werden. In nur 10 % fanden sich LOH bei Marker D9S1748 (9p13) sowie in 9 % bei Marker D9S156 (9p21). In 7 % konnte eine Alleldeletion bei D9S970 (9p12-9p13) beobachtet werden. Es bestand keine Assoziation von LOH auf 9p mit dem Tumorstadium oder dem Tumorgrad sowie- im Gegensatz zu unseren Daten- mit der Metastasierung. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug für Patienten mit pT3-Tumoren ohne 9p-Deletion in dieser Studie 58 %. Alle Patienten mit nachgewiesenem LOH auf 9p verstarben an ihrem Grundleiden. (Schraml et al. 2001). Auch bei einer Mikrosatellitenmarkeranalyse von 37 papillären Nierenzellkarzinomen wurden die häufigsten Deletionen auf 9p13 (D9S171) gefunden. Hier zeigten 21 % der Fälle ein LOH. Auf 9p21 fanden sich LOH in 6 % (D9S1748), 4 % (D9S156) und in 8 % auf 9p12-9p13 (D9S970). Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten

mit LOH bei Marker D9S171 betrug 40 %, ohne Deletion 81 %. Diese Veränderungen werden auch bei klarzelligen Tumoren beobachtet. Es wird deshalb vermutet, dass die Inaktivierung von Genen auf 9p13 für die Progression beider Tumorentitäten verantwortlich ist (Schraml et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte für den Marker L5 ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Alterationen zwischen metastasierten und nichtmetastasierten klarzelligen Tumoren festgestellt werden (37,5 % vs. 6,7 %), sodass hier ein mit der Metastasierung in Verbindung stehendes Tumorsuppressorgen lokalisiert sein könnte.

Bei den Untersuchungen mit den Markern L1 (D9S937) und L4 (D9S320), die beide den Chromosomenabschnitt 9p24.1 amplifizierten, zeigten sich Aberrationen in 16,1 % (L1) und 6,5 % (L4). Bei L1 konnten mehr Deletionen in der Gruppe der metastasierten Tumoren nachgewiesen werden (25 % vs. 13,3 %). Die Untersuchung mit dem Marker L4 wies keine Unterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren nach. Der Chromosomenabschnitt 9p23 wurde mit den Markern L2(D9S925) und L6 (D9S921) untersucht. Es konnten Veränderungen in 19,4 % mit L2 und 32,3 % mit L6 bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen gefunden werden. Bei beiden Markern wurden gehäuft Alterationen in der Gruppe der metastasierten Tumoren nachgewiesen. Auch Grady et al. vermuteten bei einer Mikrosatellitenmarkeruntersuchung von 9p22-23, dass sich in diesem Abschnitt mehrere für die Karzinogenese entscheidende Gene befinden. Die häufigsten Veränderungen wurden jedoch auf 9p21 (57 %) für die Marker D9S171, D9S1749 und D9S270 angegeben (Grady et al. 2001). Das auf 9p21 lokalisierte MTS1/CDKN2 /(p16) Gen codiert für das p16 Protein, das als Inhibitor der cyclin-dependent-kinase den Übergang von der G1- zur S-Phase im Zellzyklus steuert. Eine zentrale Rolle spielt das Retinoblastom-Protein pRb. Es wird direkt nach der M-Phase dephosphoryliert und ist in dieser Form imstande, Transkriptionsfaktoren (besonders das Heterodimer aus den Faktoren E2F und DRTF1) zu binden. Damit wird die Transkription von Genen verhindert, deren Produkte für die S-Phase benötigt werden. Vor Beginn der G1-Phase erfolgt unter dem Einfluß mehrerer CDK's eine schrittweise Phosphorylierung von pRb. Nach Überschreiten des Restriktionspunktes wird die CDK2 durch das Cyclin E aktiviert, wonach pRb ein viertes Mal phosphoryliert wird und die Transkriptionsfaktoren freisetzt.

Bei 9 von 10 Zelllinien konnten Kinoshita et al. homozygote Deletionen des CDKN2 Locus nachweisen. Er fand diese Veränderung nur in einem von 55 Primärtumoren, jedoch in 3 von 5 Metastasen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Verlust der 9p21-22 Region ein spätes Ereignis in der Tumorgenese darstellt und möglicherweise mit der

Progression und der Metastasierung der Nierenzellkarzinome verbunden ist (Kinoshita et al. 1995). In anderen Studien scheint das p16 bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms eher eine untergeordnete Rolle zu spielen (Kim et al. 1997, Sanz-Casla et al. 2003). Deletionen des Chromosoms 9p21-22 werden auch bei zahlreichen anderen Tumoren wie Melanomen, Gliomen sowie Lungen- und Harnblasentumoren beschrieben. Minobe et al. fanden auch bei 38-58 % der untersuchten Mammakarzinome LOH auf 9p21-22. Eine homozygote Deletion des p16 werden auch beim Prostata- und Ovarialkarzinom, bei Sarkomen sowie der akuten lymphoblastischen Leukämie beschrieben (Löffler und Petrides 2006, Sanz-Casla et al. 2003).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass neben den in der Literatur zahlreich publizierten Veränderungen im Abschnitt 9p21-22, durch die vorliegende Arbeit weitere interessante Regionen definiert werden konnten. Die gefundenen Aberrationen mit z.T. deutlichen Unterschieden zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren machen die Existenz weiterer wichtiger Tumorsuppressorgene auf 9p wahrscheinlich.

6.1.2. Analyse genetischer Veränderungen spezifischer Regionen auf Chromosom 18

Alterationen auf Chromosom 18 waren in 47,5 % aller Tumoren nachweisbar. Es fanden sich, wie auch bei der Untersuchung von Chromosom 9, mehr Veränderungen in metastasierten Tumoren (57,1% vs. 36,8%). Auch unter Berücksichtigung der klarzelligen Tumoren (62,5 % metastasiert vs. 40 % nichtmetastasiert) konnten- absolut gesehen- mehr Veränderungen bei den metastasierten Tumoren nachgewiesen werden. Für die Marker M1-M4 zeigten sich Alterationen häufiger in der Gruppe der nichtmetastasierten Tumoren. Auch unter Berücksichtigung ausschließlich klarzelliger Tumoren fand sich ein ähnliches Ergebnis. Mit Marker M6 (18q22.3) konnten wir bei 4 metastasierten (19,0 %) und einem nichtmetastasierten Tumor (5,3 %) Veränderungen nachweisen. Noch deutlicher waren die Ergebnisse für den von uns eingesetzten Marker M7 (18q21). Mit ihm konnten wir in der Gruppe der metastasierten Tumoren Alterationen in 56,3 % der metastasierten und bei 20 % der nichtmetastasierten Tumoren nachweisen. Auffällig war dabei eine Häufung von homozygoten Deletionen in der Gruppe der metastasierten klarzelligen Tumoren, welche wir in 50 % der Fälle beobachteten. Diese Veränderungen waren bei den nichtmetastasierenden Tumoren nur in 13 % der Fälle zu finden und lassen auf mit der Metastasierung in Verbindung stehende Tumorsuppressorgene in diesem Chromosomenabschnitt schließen.

In der Literatur finden sich kontroverse Aussagen zu den molekulargenetischen Veränderungen auf Chromosom 18. Presti et al. fanden bei CGH-Untersuchungen keine Verluste auf Chromosom 18q, bei Mikrosatellitenmarkeruntersuchungen konnten jedoch Verluste auf 18q21.3-qter nachgewiesen werden (Presti, Jr. et al. 1993, Presti, Jr. et al. 1996).

Deletionen von 18q werden auch beim kolorektalen Karzinom beschrieben, wobei die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie dem DCC- und dem SMAD4-Gen auf 18q21 eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Auch bei anderen Malignomen wie Mamma-, Magen-, Dünndarm-, Ovarial- und Cervixkarzinom werden diese Veränderungen nachgewiesen.

Mikrosatellitenmarkeruntersuchungen von Hirata et al. zeigten die höchste LOH-Frequenz bei 18q21.3. Ein Zusammenhang mit dem Tumorstadium konnte nicht festgestellt werden. Weitere molekulargenetische Untersuchungen konnten Verluste von genetischem Material auf Chromosom 18q gehäuft bei kolorektalen- und Lungentumoren nachweisen. Hirata et al. beschrieben beim Nierenzellkarzinom in 13,5 % einen LOH im Bereich 18q21.3. Bei dem dort lokalisierten DCC-Gen könnte es sich auch um ein Tumorsuppressorgen beim Nierenzellkarzinom handeln (Hirata et al. 2005). Nach Brooks et al. scheint das DCC-Gen beim Nierenzellkarzinom keine Rolle zu spielen (Brooks et al. 1993).

6.2. Analyse der chromosomalen Veränderungen mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) in Korrelation zur Metastasierung

Als zweiter Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der chromosomalen Veränderungen mittels Vergleichender Genomischer Hybridisierung (CGH). Junker et al. untersuchten 43 metastasierte Tumoren mit korrespondierenden Metastasen sowie 15 nichtmetastasierte Tumoren. Es fand sich in den metastasierten Tumoren eine erhöhte Anzahl von Aberrationen pro Tumor (3,7 vs. 3,0). Die häufigsten Veränderungen bei den metastasierten Tumoren waren, wie in der vorliegenden Arbeit, Verluste der Chromosomen 6, 9 und 18 (Junker et al. 2000).

Kallio et al. zeigten bei einer CGH-Untersuchung von 20 Nierenzellkarzinomen (17 klarzellige Tumoren) in 70 % Deletionen von 3p (3p14-25). Hier ist eine deutliche Übereinstimmung mit unseren Daten zu verzeichnen. Wir konnten Verluste in 87,5 % bei metastasierten und in 66,7 % bei nichtmetastasierten Tumoren nachweisen (Kallio et al. 2004). Ähnliche Häufigkeiten wurden auch bei CGH-Untersuchungen von Bissig et al. angegeben. In einer Untersuchung von 32 Nierenzellkarzinommetastasen und 19

korrespondierenden Primärtumoren mittels vergleichender genomischer Hybridisierung zeigten Deletionen von 3p 63% der Fälle (Bissig et al. 1999). Bei Jiang et al. wird –3p mit 61% angegeben. Diese Arbeitsgruppe erstellte 2000 ein Baummodell, um die genetischen Veränderungen bei der Tumorprogression aufzuzeigen. Danach scheint es zwei Subklassen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen zu geben: Nach –4q sind in der einen Gruppe –9p, -13q und –18q, in der anderen Gruppe +17p, +17q und –6q einzuordnen. Diesen Veränderungen geht der Verlust von 4q voraus. Zugewinne auf Chromosom 5q, 17p und 17q waren assoziiert mit guter Tumordifferenzierung. Verluste der Chromosomen 9p, 13q und 18q waren unabhängig von Tumorgrad und –differenzierung (Jiang et al. 2000).

Die Häufigkeit von Deletionen des Chromosoms 9p wird in der Literatur zwischen 15 % (Kallio et al. 2004) und 36 % (Verdorfer et al. 1998) angegeben. Verluste des Chromosomenarmes 9p beobachteten wir bei den metastasierten Tumoren in 18,8 %. Deutlich häufiger waren Deletionen von 9q, die in 37,5 % der Fälle auftraten. Bei nichtmetastasierten Tumoren war diese Veränderung nur in 6,7 % nachzuweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen- neben dem in dieser Arbeit durch Mikrosatellitenanalyse untersuchten p-Arm- weitere Tumorsuppressorgene auf 9q vermutet werden.

Signifikant mehr Deletionen bei metastasierenden Tumoren konnten wir auf Chromosom 14 beobachten (43,8 % vs. 6,7 %). Auch Beroud et al. wiesen *allelic imbalance* auf Chromosom 14 bei fortgeschrittenen Tumoren nach. Somit scheint dies ein wichtiger prognostischer Faktor zu sein (Beroud et al. 1996). Ebenso waren in einer Arbeit von Kaku et al. *loss of heterozygosity* 14q24-31 mit einer schlechten Prognose verbunden (Kaku et al. 2004). Herbers et al. fanden eine Korrelation von LOH 14q und Differenzierungsgrad sowie Tumorstadium. Es bestand kein Zusammenhang zwischen LOH 14q und der Tumorgroße (Herbers et al. 1997).

Deletionen der Chromosomenarme 9q und 14q scheinen aufgrund der erhobenen Daten Tumorsuppressorgene zu beherbergen, die mit Metastasierung in Verbindung stehen.

6.3. Vergleich der mit Hilfe der MSA und der CGH identifizierten genetischen Veränderungen

Der direkte Vergleich der Ergebnisse, wie oben aufgeführt, zeigt Unterschiede zwischen CGH- und PCR-Analyse. Es konnten deutlich mehr Aberrationen mit der Mikrosatellitenmarkeranalyse aufgezeigt werden. Ursächlich hierfür ist die geringere Sensitivität der CGH-Methode. Durch dieses Verfahren können Deletionen oder Zugewinne ab einer Größe von ca. 10 MB nachgewiesen werden. Die MSA dagegen erlaubt auch den Nachweis kleiner DNA-Abschnitte im Bereich von 150 Basenpaaren (Weber und May 1989). Durch Kontamination der Tumorprobe mit Normalgewebe, Entzündungszellen oder Fibroblasten kann durch die Mikrosatellitenmarkeranalyse lediglich eine Signalabschwächung und kein vollständiger Signalverlust im Sinne eines LOH beobachtet werden. Allelverluste werden so möglicherweise nicht erkannt. Auch durch Tumorerheterogenität können Verluste der Heterozygotie nur in einem Teil der Neubildung nachgewiesen werden. Schließlich beeinflusst auch die unterschiedliche Sensitivität der Marker die Ergebnisse.

7. Schlußfolgerung

Im ersten Teil der Arbeit konnten durch Verwendung von jeweils 6 Markern für die Chromosomen 9 und 18 signifikant mehr Aberrationen bei metastasierten Tumoren nachgewiesen werden. Dabei besteht eine Korrelation zwischen der Zahl der genetischen Veränderungen mit dem Grading sowie dem T-Stadium. Mit jeweils einem Marker wiesen wir signifikante Unterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren nach. Dabei scheint insbesondere die Inaktivierung von Genen auf 9p13, wie auch in der Literatur angegeben, für die Progression und Metastasierung eine entscheidende Rolle zu spielen.

Über molekulargenetische Veränderungen auf Chromosom 18 bei Nierenzellkarzinomen finden sich in der Literatur nur wenig Angaben. Mit dem von uns verwendeten Marker M7 (D18S541; 18q21) konnte eine interessante Region eingegrenzt werden, die bisher noch keine Beachtung fand. Hier zeigten sich signifikant mehr Veränderungen in der Gruppe der metastasierten klarzelligen Tumoren mit deutlicher Häufung von homozygoten Deletionen. Diese Erkenntnisse bieten Ansatzmöglichkeiten für weiterführende Untersuchungen.

Im zweiten Teil analysierten wir die gleichen Proben mittels Vergleichender Genomischer Hybridisierung. Die nachgewiesenen Chromosomenverluste treten in hohem Maße mit gleicher Häufigkeit, wie in der Literatur beschrieben, auf. Wir fanden insbesondere Chromosomenverluste bei metastasierten klarzelligen Tumoren auf 3p, 4q, 5q, 6p, 8p, 9, 10q, 13, 14, 17p, 18. Auf 3q, 6q, 8q, 15p und 17q überwogen Verluste bei nichtmetastasierten Tumoren. Zugewinne konnten wir bei metastasierten Tumoren für die Chromosomen 7, 8q, 12 und 13q, bei nichtmetastasierten Tumoren für 2q, 3q, 4, 5 und 18q verzeichnen. Insbesondere scheinen Deletionen der Chromosomen 9q, 14q und 18p mit Metastasierung assoziierte Veränderungen darzustellen, da hier signifikante Unterschiede in den von uns untersuchten Gruppen auffielen.

Die CGH ist somit geeignet, zunächst kritische Chromosomen bzw. chromosomale Regionen über das gesamte Genom zu definieren, die mit einer Erkrankung oder, wie in dieser Studie, mit der Metastasierung assoziiert sind. Anschließend kann die MSA eingesetzt werden, um diese kritischen Regionen hinsichtlich ihrer Wertigkeit zu evaluieren und auf kleinste genomische Regionen einzuschränken. Mögliche Kandidatengene können so identifiziert werden. In Zukunft erscheint es möglich, das Metastisierungsrisiko anhand spezifischer genetischer Muster abzuleiten.

8. Anhang

8.1. Tabellen

Tumor-Nr.	Geschlecht	TNM-Klassifikation	Grading	Histologie
5	w	pT3a	G2	klarzellig
19	w	pT2	nicht bekannt	klarzellig
20	w	pT2	G2	chromophil
21	w	pT2	G2	klarzellig
24	w	pT2	nicht bekannt	unklar
25	m	pT2	G2	klarzellig
30	w	pT2	G1	klarzellig
31	w	pT2	G1	chromophil
36	w	pT2	G2	klarzellig
37	m	pT2	G1	klarzellig
46	w	pT2	G2	klarzellig
68	w	pT1	G1	klarzellig
79	m	pT1	G2	klarzellig
111	w	pT1	G2	klarzellig
121	w	pT3b	G2	klarzellig
123	m	pT3a	G2	chromophob
124	m	pT3a	G1	klarzellig
138	w	pT1	G1	klarzellig
156	w	pT1	G1	klarzellig

Tabelle 11: Nichtmetastasierte Tumoren; Geschlecht der Patienten, TNM-Klassifikation, Grading und Histologie.

Tumor-Nr.	Geschlecht	TNM-Klassifikation	Grading	Histologie
6	m	nicht bekannt	G2	Adeno-Ca
29	w	pT2	G2	chromophil
33	m	pT3a	G2	klarzellig
38	m	pT4	G3	klarzellig
39	m	pT2	G2	chromophob
40	m	pT2	G2	klarzellig
47	w	pT2	G2	klarzellig
48	m	pT1	G2	klarzellig
50	m	pT3a	G2	klarzellig
63	m	pT3a	G2	klarzellig
66	m	pT3b	G2	klarzellig
69	m	pT2	G2	klarzellig
74	m	pT3b	G2	klarzellig
77	m	pT3a	G2	klarzellig
92	m	pT3a	G2	klarzellig
127	m	pT2	G2	chromophob
150	m	pT2	G2	chromophob
151	m	pT3b	G2	klarzellig
161	m	pT3b	G2	klarzellig
166	m	pT3b	G2	klarzellig
167	w	pT3a	G2	klarzellig

Tabelle 12: Metastasierte Tumoren; Geschlecht der Patienten, TNM-Klassifikation, Grading und Histologie.

Fall-Nr.	Primer L1	Primer L2	Primer L3	Primer L4	Primer L5	Primer L6
5	o	o	o	o	o	LOH
19	-	o	o	-	o	HD
20	LOH	LOH	LOH	-	o	-
21	o	-	LOH	-	o	-
24	LOH	-	LOH	Shift	Shift	HD
25	o	o	o	o	o	-
30	-	o	-	o	o	-
31	o	o	-	o	o	o
36	o	o	-	o	-	-
37	o	o	o	-	-	-
46	o	o	o	o	o	-
68	-	-	LOH	o	-	-
79	NI	LOH	-	o	o	HD
111	o	-	o	o	-	-
121	LOH	LOH	Shift	LOH	LOH	LOH
123	-	o	LOH	o	o	-
124	o	o	o	-	o	-
138	o	-	o	o	-	-
156	o	o	-	o	o	-

Tabelle 13: Beobachtete Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten von 9p (nichtmetastasierte Tumoren); LOH (Verlust der Heterozygotie), Shift (Verkürzung oder Verlängerung des Allels durch Verlust oder Hinzufügen von genetischem Material), o (erhaltene Heterozygotie), - (unveränderte Homozygotie), HD (homozygote Deletion).

Fall-Nr.	Primer L1	Primer L2	Primer L3	Primer L4	Primer L5	Primer L6
6	Shift	-	-	LOH	LOH	LOH
29	LOH	LOH	-	-	LOH	HD
33	o	LOH	LOH	-	o	HD
38	LOH	o	-	-	o	HD
39	o	o	o	o	o	HD
40	LOH	-	LOH	o	LOH	-
47	o	-	-	-	LOH	-
48	o	o	-	-	-	-
50	-	o	LOH	-	o	HD
63	o	-	-	o	LOH	HD
66	LOH	o	LOH	-	o	HD
69	-	o	o	-	o	-
74	-	o	o	o	o	-
77	o	o	o	o	o	HD
92	-	LOH	o	-	LOH	-
127	-	o	LOH	-	-	-
150	LOH	-	LOH	LOH	LOH	LOH
151	-	-	-	o	o	-
161	o	o	LOH	o	o	-
166	o	LOH	o	o	LOH	o
167	LOH	LOH	-	LOH	LOH	-

Tabelle 14: Beobachtete Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten von 9p (metastasierte Tumoren); LOH (Verlust der Heterozygotie), Shift (Verkürzung oder Verlängerung des Allels durch Verlust oder Hinzufügen von genetischem Material), o (erhaltene Heterozygotie), - (unveränderte Homozygotie), HD (homozygote Deletion).

Fall-Nr.	Primer M1	Primer M2	Primer M3	Primer M4	Primer M6	Primer M7
5	o	-	o	o	o	-
19	-	-	o	-	-	HD
20	-	-	o	-	-	o
21	Shift	LOH	o	LOH	-	o
24	-	HD	HD	HD	HD	-
25	o	o	o	o	o	o
30	o	-	-	o	o	o
31	-	-	o	o	-	o
36	o	o	-	o	o	o
37	o	o	o	o	-	o
46	-	-	o	-	o	o
68	-	o	o	-	o	o
79	o	-	-	-	-	HD
111	LOH	-	o	o	o	o
121	-	LOH	Shift	-	-	o
123	-	-	o	o	o	o
124	LOH	LOH	LOH	LOH	-	LOH
138	-	o	o	-	-	o
156	-	o	o	-	-	o

Tabelle 15: Beobachtete Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten von 18q (nichtmetastasierte Tumoren); LOH (Verlust der Heterozygotie), Shift (Verkürzung oder Verlängerung des Allels durch Verlust oder Hinzufügen von genetischem Material), o (erhaltene Heterozygotie), - (unveränderte Homozygotie), HD (homozygote Deletion).

Fall-Nr.	Primer M1	Primer M2	Primer M3	Primer M4	Primer M6	Primer M7
6	LOH	-	o	LOH	LOH	-
29	o	o	o	o	o	-
33	o	LOH	-	o	-	HD
38	-	-	-	o	o	HD
39	o	-	o	-	LOH	HD
40	o	LOH	LOH	-	-	LOH
47	o	o	o	LOH	LOH	HD
48	-	-	-	o	-	o
50	o	o	-	o	o	-
63	-	-	o	o	o	HD
66	o	o	o	o	o	HD
69	o	o	o	o	o	-
74	o	-	-	-	-	-
77	o	o	o	-	-	o
92	-	o	o	-	HD	HD
127	-	o	o	o	-	-
150	o	o	-	o	o	o
151	-	-	o	o	o	HD
161	o	LOH	-	o	-	LOH
166	-	LOH	LOH	o	o	HD
167	-	-	o	o	o	o

Tabelle 16: Beobachtete Veränderungen in den untersuchten Chromosomenabschnitten von 18q (metastasierte Tumoren); LOH (Verlust der Heterozygotie), Shift (Verkürzung oder Verlängerung des Allels durch Verlust oder Hinzufügen von genetischem Material), o (erhaltene Heterozygotie), - (unveränderte Homozygotie), HD (homozygote Deletion).

Fall-Nr	CGH	MSA-9	MSA-18
5	Dim(3p24,17), enh(4q,5q,8q)	9p23	
19 P1	Dim(3q21pter), enh(6q,7)	9p23	18q21
19 P2			
20 P1	Enh(3,11,13q18q), dim(6p)	9p23, 9p13	
20 P2		9p23, 9p13, 9p24.1	
21	Dim(3p,18p), enh(5q,18q)	9p13	18q23, 18q22.1, 18q12.1
24		9p24.1, 9p23, 9p13	18q22.1, 18q22.3, 18q12.1
25	Enh(2q,4,5), dim(16p)		
30 P1	Dim(3p21,6p)		
30 P2			
31	Enh(3,7,12)		
36	Enh(2q,5), dim(3,8,17)		
37	Dim(3p,enh(2q))		
46 P1	Enh(4,5,7q,8q,13q,18q)		
46 P2			
68	Dim(3p,6p,14q24qter,17), enh(5q14,7)	9p13	
79 P1	O	9p23	18q21
79 P1	O	9p23, 9p24.1	18q21
111	Dim(3p14pter,17),enh(5q,7)		18q23
121 P1	Dim(3p,9,15), enh(3q21qter,5q)	9p24.1, 9p23, 9p13	18q22.3, 18q22.1
121 P2			18q22.3
123	Dim(3p13pter), enh(5q)	9p13	
124 P1	Dim(3p14pter,16p), enh(5,12)		18q23, 18q22.1, 18q22.3, 18q12.1, 18q21
124 P2			
138	Dim(3p14pter)		
156	O		

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Ergebnisse der CGH und der MSA bei nichtmetastasierten Tumoren (P1 und P2 stehen für verschiedene Gewebeproben eines Tumors)

Fall-Nr	CGH	MSA-3	MSA-9	MSA-18
6 P1	Enh(5p),dim(5q),dim(6p),enh(6q22qter), dim(8p),enh(8q),enh(10),dim(17),dim(18)	3p12	9p24.1, 9p13, 9p23	18q23, 18q12.1, 18q22.3
6 P2		3p12	9p24.1, 9p13, 9p23	18q23, 18q12.1, 18q22.3
29 P1	Enh(7q),dim(8),dim(9q)		9p24.1, 9p13, 9p23	
29 P2	Enh(7q),dim(8),dim(9q),dim(14q)		9p24.1, 9p13, 9p23	
33 P1	Dim(3p14pter),dim(6p),dim(9q),enh(13q)	3p14.2-21.1, 3p25-26	9p23, 9p13	18q21
33 P2	Dim(3p14pter),dim(6p),dim(9q),dim(17)	3p14.2-21.1, 3p25-26	9p23, 9p13	18q22.1, 18q21
38 P1	Dim(3p14pter),enh(5q21qter),enh(7), enh(8q21qter),dim(9q),dim(14q14qter)	3p21-23 3p14.2-21.1 3p12 3p25-26 3p12-14.1	9p24.1, 9p23	18q21
38 P2	Dim(3p13pter),enh(5q21qter), dim(14q21q24),dim(17q)		9p24.1, 9p13, 9p23	
39	Dim(3p),enh(5),dim(p),enh(8q),enh(13q), dim(18p)	3p14.2-21.1, 3p12, 3p25-26	9p23	18q22.3, 18q21
40	Dim(3p14pter),enh(3p14qter),enh(7), enh(8q),dim(9q)dim(14q),dim(15q), dim(17p)		9p24.1, 9p13	18q22.1, 18q21, 18q22.3
47	Dim(18p)		9p13	18q22.3, 18q12.1, 18q21
48 P1	Unauffällig			
48 P2	Unauffällig			
50 P1	Dim(3p14pter),dim(17p)	3p25-26	9p13, 9p23	
50 P2	Dim(3p14pter),dim(17p)dim(18p11.2)		9p13, 9p23	
63 P1	Dim(1),dim(3p14),dim(5q),dim(9q), dim(16p),dim(18p11.2)	3p14.2-21.1	9p13, 9p23	18q21
63 P2	Dim(1p),dim(3p14),dim(6p),dim(8p),dim(9), dim(10q),dim(13)	3p14.2-21.1, 3p.12	9p24.1, 9p13, 9p23	
66 P1	Unauffällig		9p24.1, 9p13, 9p23	18q21
66 P2	Dim(3p14p23),enh(7q),enh(12),dim(14), dim(17p),dim(18p)	3p21-23, 3p14.2-21.1, 3p12, 3p25- 26	9p13, 9p23	18q22.1, 18q21
69 P1	Unauffällig			
69 P2	Dim(3p14),dim(6p),dim(16p)	3p21-23		
74	Dim(3p14p23),dim(9q22qter),enh(12)			
77 P1	Dim(3p),enh(5q21qter),enh(7)?,dim(14)	3p12, 3p14.2-21.1, 3p25-26	9p23	
77 P2	enh(5q21qter)		9p23	
92	Dim(3p11pter),enh(5),dim(8p),enh(8q),	3p14.2-21.1		

	dim(9),enh(12)			
571 (= Metastase von Fall 92)	Enh(5),enh(8q),enh(12)	3p14.2-21.1, 3p21-23 3p12	9p13	18q22.3, 18q21
127	Enh(4)?,enh(5)?,enh(11),enh(18q)		9p13	
150	Dim(3),enh(5),dim(9q),dim(14q21qter)	3p14.2-21.1, 3p12, 3p25- 26, 3p12- 14.1	9p24.1, 9p13, 9p23	
151	Dim(3p14pter),enh(5q21qter),dim(8p), dim(14q21q24)			18q21
161 P1			9p13	
161 P2				18q22.1, 18q21
166	Dim(3p),enh(5),dim(14q21qter)dim(18q)	3p21-23, 3p12, 3p25- 26, 3p12-14.1		18q21, 18q22.1
167 P1	Enh(2q32pter),dim(3p),dim(4q13q28), enh(5q31qter),enh(6q),dim(7q),dim(10q22, enh(13q22qter),dim(14q13qter),dim(16q), dim(17p)	3p14.2-21.1, 3p12	9p24.1, 9p23, 9p13	
167 P2	Enh(2q32pter),dim(3p),dim(4q13q28), enh(5q31qter),enh(8q23qter), dim(9p21pter),dim(10q22),enh(11p),dim(1 4q13qter),dim(17p)	3p14.2-21.1, 3p12	9p24.1, 9p23	

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse der CGH und der MSA bei metastasierten Tumoren (P1 und P2 stehen für verschiedene Gewebeproben eines Tumors)

8.2. Literaturverzeichnis

Aikele P, Kittner Th, Laniado M. 2001. Bildgebende Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. *Onkologie*:730-742.

Amato RJ. 2000. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin.Oncol.*, 27(2):177-186.

Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, Vielh P, El Naggar AK, Oudard S, Boiteux S, Radicella JP. 2000. Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res.*, 60(17):4740-4744.

Becker F, Siemer S, Hack M, Humke U, Ziegler M, Stockle M. 2006. Excellent long-term cancer control with elective nephron-sparing surgery for selected renal cell carcinomas measuring more than 4 cm. *European Urology*, 49(6):1058-1063.

Beroud C, Fournet JC, Jeanpierre C, Droz D, Bouvier R, Froger D, Chretien Y, Marechal JM, Weissenbach J, Junien C. 1996. Correlations of allelic imbalance of chromosome 14 with adverse prognostic parameters in 148 renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes.Cancer*, 17(4):215-224.

Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schaffer AA, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. 1999. Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol.*, 155(1):267-274.

Bodmer D, Eleveld M, Ligtenberg M, Weterman M, van der MA, Koolen M, Hulsbergen-van der Kaa C, Smits A, Smeets D, Geurts vK. 2002a. Cytogenetic and molecular analysis of early stage renal cell carcinomas in a family with a translocation (2;3)(q35;q21). *Cancer Genet.Cytogenet.*, 134(1):6-12.

Bodmer D, Janssen I, Jonkers Y, van den BE, Dijkhuizen T, Debiec-Rychter M, Schoenmakers E, van Kessel AG. 2002b. Molecular cytogenetic analysis of clustered sporadic and familial renal cell carcinoma-associated 3q13 approximately q22 breakpoints. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 136(2):95-100.

Boeckmann W, Jakse G. 1997. Nierenzellkarzinome, 2. Auflage):25-56.

Bonne AC, Bodmer D, Schoenmakers EF, van Ravenswaaij CM, Hoogerbrugge N, van Kessel AG. 2004. Chromosome 3 translocations and familial renal cell cancer. *Curr.Mol.Med.*, 4(8):849-854.

Brauch H, Bohm J, Hofler H. 1995. [Hippel-Lindau syndrome and sporadic renal cell carcinomas. Pathogenesis, morphologic spectrum and molecular genetics]. *Pathologe*, 16(5):321-327.

Brkovic D, Waldherr R. 1997. Histiogenese, Pathologie und prognostische Faktoren des Nierenzellkarzinoms):51-67.

Brooks JD, Bova GS, Marshall FF, Isaacs WB. 1993. Tumor suppressor gene allelic loss in human renal cancers. *J.Urol.*, 150(4):1278-1283.

Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Cheng L. 2003. Metanephric adenoma lacks the gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y that are typical of papillary renal cell carcinoma and papillary adenoma. *Mod.Pathol.*, 16(10):1060-1063.

Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Delahunt B, Cheng L. 2005. Eosinophilic and classic chromophobe renal cell carcinomas have similar frequent losses of multiple chromosomes from among chromosomes 1, 2, 6, 10, and 17, and this pattern of genetic abnormality is not present in renal oncocytoma. *Mod.Pathol.*, 18(2):161-169.

Chow WH, McLaughlin JK, Mandel JS, Wacholder S, Niwa S, Fraumeni JF, Jr. 1996. Obesity and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 5(1):17-21.

Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CH, Maher ER. 1998. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes Chromosomes.Cancer*, 22(3):200-209.

Dörsam J, Staehler G. 2001. Pathologie und Staging des Nierenzellkarzinoms. *Onkologe*):707-714.

- Drabkin HA, Bradley C, Hart I, Bleskan J, Li FP, Patterson D. 1985. Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t(3;8)(p14.2;q24.13) chromosomal translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 82(20):6980-6984.
- Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zbarovsky ER. 2001. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98(13):7504-7509.
- Druck T, Podolski J, Byrski T, Wyrwicz L, Zajaczek S, Kata G, Borowka A, Lubinski J, Huebner K. 2001. The DIRC1 gene at chromosome 2q33 spans a familial RCC-associated t(2;3)(q33;q21) chromosome translocation. *J.Hum.Genet.*, 46(10):583-589.
- Eleveld MJ, Bodmer D, Merks G, Siepmann A, Sprenger SH, Weterman MA, Ligtenberg MJ, Kamp J, Stapper W, Jeuken JW, Smeets D, Smits A, Geurts vK. 2001. Molecular analysis of a familial case of renal cell cancer and a t(3;6)(q12;q15). *Genes Chromosomes.Cancer*, 31(1):23-32.
- Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Caton JR, Jr., Munshi N, Crawford ED. 2001. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N.Engl.J.Med.*, 345(23):1655-1659.
- Friedrich CA. 2001. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, 10(7):763-767.
- Fuzesi L, Cober M, Mittermayer C. 1992. Collecting duct carcinoma: cytogenetic characterization. *Histopathology*, 21(2):155-160.
- Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Ross RK, Yu MC. 1999. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer*, 81(3):542-548.
- Gemmill RM, West JD, Boldog F, Tanaka N, Robinson LJ, Smith DI, Li F, Drabkin HA. 1998. The hereditary renal cell carcinoma 3;8 translocation fuses FHIT to a patched-related gene, TRC8. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95(16):9572-9577.

German Society of Urology. 1998. Kidney parenchyma carcinoma--diagnosis. *Urologe A*, 37(3):328-341.

Grady B, Goharderakhshan R, Chang J, Ribeiro-Filho LA, Perinchery G, Franks J, Presti J, Carroll P, Dahiya R. 2001. Frequently deleted loci on chromosome 9 may harbor several tumor suppressor genes in human renal cell carcinoma. *J.Urol.*, 166(3):1088-1092.

Hallscheidt P, Pomer S, Roeren T, Kauffmann GW, Staehler G. 2000. [Preoperative staging of renal cell carcinoma with caval thrombus: is staging in MRI justified? Prospective histopathological correlated study]. *Urologe A*, 39(1):36-40.

Hamm M, Weckermann D, Wawroschek F, Kauczor HU. 2001. Palliation und Supportivtherapie beim inkurablen Nierenzellkarzinom. *Onkologe*:767-771.

Handa K, Kreiger N. 2002. Diet patterns and the risk of renal cell carcinoma. *Public Health Nutr.*, 5(6):757-767.

Harris P, Morton CC, Guglielmi P, Li F, Kelly K, Latt SA. 1986. Mapping by chromosome sorting of several gene probes, including c-myc, to the derivative chromosomes of a 3;8 translocation associated with familial renal cancer. *Cytometry*, 7(6):589-594.

Hellsten S, Berge T, Wehlin L. 1981. Unrecognized renal cell carcinoma. Clinical and diagnostic aspects. *Scand.J.Urol.Nephrol.*, 15(3):269-272.

Hellsten S, Johnsen J, Berge T, Linell F. 1990. Clinically unrecognized renal cell carcinoma. Diagnostic and pathological aspects. *European Urology*, 18 Suppl 2):2-3.

Herbers J, Schullerus D, Muller H, Kenck C, Chudek J, Weimer J, Bugert P, Kovacs G. 1997. Significance of chromosome arm 14q loss in nonpapillary renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes.Cancer*, 19(1):29-35.

Hirata H, Matsuyama H, Matsumoto H, Korenaga Y, Ohmi C, Sakano S, Yoshihiro S, Naito K. 2005. Deletion mapping of 18q in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 163(2):101-105.

- Holzel D, Altwein JE. 1991. [Tumors of the urogenital tract: clinico-epidemiologic facts]. *Urologe A*, 30(2):134-138.
- Jiang F, Desper R, Papadimitriou CH, Schaffer AA, Kallioniemi OP, Richter J, Schraml P, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. 2000. Construction of evolutionary tree models for renal cell carcinoma from comparative genomic hybridization data. *Cancer Res.*, 60(22):6503-6509.
- Junker K. 2003. [Molecular diagnostics of renal diseases with underlying genetic predisposition]. *Urologe A*, 42(5):624-633.
- Junker K, Moravek P, Podhola M, Weirich G, Hindermann W, Janitzky V, Schubert J. 2000. Genetic alterations in metastatic renal cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization: correlation with clinical and histological data. *Int.J.Oncol.*, 17(5):903-908.
- Kaku H, Ito S, Ebara S, Ouchida M, Nasu Y, Tsushima T, Kumon H, Shimizu K. 2004. Positive correlation between allelic loss at chromosome 14q24-31 and poor prognosis of patients with renal cell carcinoma. *Urology*, 64(1):176-181.
- Kallio JP, Mahlamaki EH, Helin H, Karhu R, Kellokumpu-Lehtinen P, Tammela TL. 2004. Chromosomal gains and losses detected by comparative genomic hybridization and proliferation activity in renal cell carcinoma. *Scand.J.Urol.Nephrol.*, 38(3):225-230.
- Kamura T, Conrad MN, Yan Q, Conaway RC, Conaway JW. 1999. The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev.*, 13(22):2928-2933.
- Kao GD, Malkowicz SB, Whittington R, D'Amico AV, Wein AJ. 1994. Locally advanced renal cell carcinoma: low complication rate and efficacy of postnephrectomy radiation therapy planned with CT. *Radiology*, 193(3):725-730.
- Kath R. 2003. Nierenzellkarzinome. <http://www.onkodin.de>.

Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Fong KM, Sekido Y, Minna JD, Hong WK, Mao L. 1997. Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 57(3):400-403.

Kinoshita H, Yamada H, Ogawa O, Kakehi Y, Osaka M, Nakamura E, Mishina M, Habuchi T, Takahashi R, Sugiyama T, . 1995. Contribution of chromosome 9p21-22 deletion to the progression of human renal cell carcinoma. *Jpn.J.Cancer Res.*, 86(9):795-799.

Kinouchi T, Saiki S, Meguro N, Maeda O, Kuroda M, Usami M, Kotake T. 1999. Impact of tumor size on the clinical outcomes of patients with Robson State I renal cell carcinoma. *Cancer*, 85(3):689-695.

Knudson AG, Jr. 1986. Genetics of human cancer. *Annu.Rev.Genet.*, 20):231-251.

Kovacs G. 1999. [Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors]. *Urologe A*, 38(5):433-441.

Kovacs G, Brusa P, De Riese W. 1989. Tissue-specific expression of a constitutional 3;6 translocation: development of multiple bilateral renal-cell carcinomas. *Int.J.Cancer*, 43(3):422-427.

Kovacs G, Hoene E. 1988. Loss of der(3) in renal carcinoma cells of a patient with constitutional t(3;12). *Hum.Genet.*, 78(2):148-150.

Kugler A, Zöller G, Ringert R-H. 2001. Therapieformen des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *Onkologe*):751-758.

Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, . 1993. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260(5112):1317-1320.

Leitlinien-Informationssystem der AWMF. 2001. Interdisziplinäre Kurzgefaßte Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie.
<http://leitlinien.net/>.

Lindblad P, Chow WH, Chan J, Bergstrom A, Wolk A, Gridley G, McLaughlin JK, Nyren O, Adami HO. 1999. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*, 42(1):107-112.

Liu N, Gong K, Zhang N, Guo HF, Na X, Wu G, Na YQ. 2005. [Analysis of biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene VHL in patients of renal cell carcinoma patient]. *Zhonghua Wai Ke.Za Zhi.*, 43(2):115-117.

Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PFA, Patard J-J, Sinescu IC. 2007. Guidelines on Renal Cell Carcinoma. http://www.uroweb.org/fileadmin/user_upload/Guidelines/08_Renal_Cell_Carcinoma_2007.pdf):13-14.

Löffler, Petrides. 2006. Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage. Berlin Heidelberg New York. Springer-Verlag.

Lopez HE, Kirchner H, Atzpodien J. 1996. Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J.Urol.*, 155(1):19-25.

Lott ST, Lovell M, Naylor SL, Killary AM. 1998. Physical and functional mapping of a tumor suppressor locus for renal cell carcinoma within chromosome 3p12. *Cancer Res.*, 58(16):3533-3537.

Lottspeich F, Zorbas H. (1998) Bioanalytik. Heidelberg, Berlin: Spektrum 1998; 847-849

McCredie M, Stewart JH. 1992. Risk factors for kidney cancer in New South Wales, Australia. II. Urologic disease, hypertension, obesity, and hormonal factors. *Cancer Causes Control*, 3(4):323-331.

Mellemgaard A, Engholm G, McLaughlin JK, Olsen JH. 1994. Risk factors for renal-cell carcinoma in Denmark. III. Role of weight, physical activity and reproductive factors. *Int.J.Cancer*, 56(1):66-71.

Meloni-Ehrig AM. 2002. Renal cancer: cytogenetic and molecular genetic aspects. *Am.J.Med.Genet.*, 115(3):164-172.

Mickisch GH, Garin A, Van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. 2001. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*, 358(9286):966-970.

Mostofi FK, Sesterhenn IA, Sobin LH. Histological typing of kidney tumours. In: International histologic classification of tumors, No. 25. Geneva, WHO 1981

Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. 2002. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, 20(1):289-296.

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Russo P, Berg WJ, Metz EM. 2000. Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, 18(9):1928-1935.

Munk K: 2001. Grundstudium Biologie: Genetik. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag, 2/21-2/25.

Pathak S, Strong LC, Ferrell RE, Trindade A. 1982. Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells. *Science*, 217(4563):939-941.

Pause A, Lee S, Lonergan KM, Klausner RD. 1998. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95(3):993-998.

Plasswilm L, Kortmann RD, Hehr T, Bamberg M. 2003. Therapieansätze beim Nierenzellkarzinom aus der Sicht der Strahlentherapie. *Onkologe*):759-766.

Pomer S, Schubert J, Schmitz-Dräger B, Vogers GE. 1998. Nierenparenchymkarzinom):1-29.

Pomer S, Staehler G. 1998. Biologische Marker beim Nierenzellkarzinom. *Onkologe*, 4):229-236.

Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Waldman FM. 1996. Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J.Urol.*, 156(1):281-285.

- Presti JC, Jr., Reuter VE, Cordon-Cardo C, Mazumdar M, Fair WR, Jhanwar SC. 1993. Allelic deletions in renal tumors: histopathological correlations. *Cancer Res.*, 53(23):5780-5783.
- Presti JC, Jr., Wilhelm M, Reuter V, Russo P, Motzer R, Waldman F. 2002. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. *J.Urol.*, 167(3):1464-1468.
- Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. 1969. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J.Urol.*, 101(3):297-301.
- Rodriguez-Perales S, Melendez B, Gribble SM, Valle L, Carter NP, Santamaria I, Conde L, Urioste M, Benitez J, Cigudosa JC. 2004. Cloning of a new familial t(3;8) translocation associated with conventional renal cell carcinoma reveals a 5 kb microdeletion and no gene involved in the rearrangement. *Hum.Mol.Genet.*, 13(9):983-990.
- Roigas J. 2006. Nierenzellkarzinom: Neue Substanzen im Test.
<http://www.aerztlichepraxis.de>.
- Sanz-Casla MT, Maestro ML, del B, V, Zanna I, Moreno J, Vidaurreta M, Almansa I, Fernandez C, Blanco J, Maestro C, Resel L. 2003. Loss of heterozygosity and methylation of p16 in renal cell carcinoma. *Urol.Res.*, 31(3):159-162.
- Schlichter A, Wunderlich H, Junker K, Kosmehl H, Schubert J. 1999. [Limits for organ-preserving surgery in renal cell carcinoma]. *Urologe A*, 38(5):479-485.
- Schraml P, Muller D, Bednar R, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. 2000. Allelic loss at the D9S171 locus on chromosome 9p13 is associated with progression of papillary renal cell carcinoma. *J.Pathol.*, 190(4):457-461.
- Schraml P, Struckmann K, Bednar R, Fu W, Gasser T, Wilber K, Kononen J, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. 2001. CDKN2A mutation analysis, protein expression, and deletion mapping of chromosome 9p in conventional clear-cell renal carcinomas: evidence for a second tumor suppressor gene proximal to CDKN2A. *Am.J.Pathol.*, 158(2):593-601.

Sidhar SK, Clark J, Gill S, Hamoudi R, Crew AJ, Gwilliam R, Ross M, Linehan WM, Birdsall S, Shipley J, Cooper CS. 1996. The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene PRCC to the TFE3 transcription factor gene. *Hum.Mol.Genet.*, 5(9):1333-1338.

Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G, Marme D. 1996. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res.*, 56(10):2299-2301.

Siemer S, Uder M. 2002. [Diagnostic imaging before kidney tumor operations]. *Urologe A*, 41(3):289-295.

Stein M, Kuten A, Halpern J, Coachman NM, Cohen Y, Robinson E. 1992. The value of postoperative irradiation in renal cell cancer. *Radiother.Oncol.*, 24(1):41-44.

Steinbach F, Stockle M, Hohenfellner R. 1992. [Diagnosis and therapy of benign and malignant kidney tumors]. *Urologe A*, 31(1):W1-10.

Stewart JH, Buccianti G, Agodoa L, Gellert R, McCredie MR, Lowenfels AB, Disney AP, Wolfe RA, Boyle P, Maisonneuve P. 2003. Cancers of the kidney and urinary tract in patients on dialysis for end- stage renal disease: analysis of data from the United States, europe, and australia and new zealand. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 14(1):197-207.

Storkel S. 1999. [Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]. *Urologe A*, 38(5):425-432.

Thoenes W, Storkel S. 1991. [Pathology of benign and malignant renal cell tumors]. *Urologe A*, 30(6):W41-W50.

Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ. 1986a. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol.Res.Pract.*, 181(2):125-143.

- Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Jacobi GH. 1986b. [Renal cell carcinoma--a classification based on cytomorphological criteria]. *Zentralbl.Allg.Pathol.*, 132(5-6):503-513.
- Verdorfer I, Culig Z, Hobisch A, Bartsch G, Hittmair A, Duba HC, Erdel M. 1998. Characterisation of a collecting duct carcinoma by cytogenetic analysis and comparative genomic hybridisation. *Int.J.Oncol.*, 13(3):461-464.
- Wagner G, Hermanek P, Wittekind Ch, Sinn HP (2001) Organspezifische Tumordokumentation. Empfehlungen zu Dokumentationsinhalten für Studien. 2.Auflage. Internetfassung ("OTD-2-Internet"). Deutsche Krebsgesellschaft, Frankfurt/Main.
- Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am.J.Hum.Genet.*, 44(3):388-396.
- Wunderlich H, Schubert J. 2001. Das Nierenzellkarzinom-Epidemiologie und klinische Bedeutung. *Onkologe*):699-706.
- Wunderlich H, Schumann S, Jantitzky V, Moravek P, Podhola M, Kosmehl H, Schubert J. 1998. Increase of renal cell carcinoma incidence in central Europe. *European Urology*, 33(6):538-541.
- Yuan JM, Castelao JE, Gago-Dominguez M, Ross RK, Yu MC. 1998. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer*, 77(9):1508-1513.
- Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, Crossey PA, Webster AR, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Brauch H, Glavac D, Neumann HP, Tisherman S, Mulvihill JJ, Gross DJ, Shuin T, Whaley J, Seizinger B, Kley N, Olschwang S, Boisson C, Richard S, Lips CH, Lerman M, . 1996. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum.Mutat.*, 8(4):348-357.

8.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die hier vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,

mich Frau PD Dr. K. Junker bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt hat,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor medicinae beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Erfurt, den 24.10.2007

8.4. Lebenslauf

8.5. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schubert, Direktor der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmöglichkeiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Kerstin Junker, Leiterin des Forschungslabors der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, bedanken, die mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift betreute und mir in allen fachlichen Fragen stets zur Seite stand.

Mein großer Dank gilt Frau Dipl.-Biochem. Gabriele Müller, welche mich in die Methode einarbeitete sowie den Medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Klötzer, Frau Jeschke und Frau Ilse für die hilfreiche Unterstützung.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten.

Schließlich danke ich meiner Freundin Esther sowie meinem Studienfreund Christian Bauer für die abschließende kritische Korrektur.